

University of Groningen

Methotrexate en radiotherapie. Een onderzoek naar de mogelijkheden van orale of intraveneuze toediening van methotrexate bij de radiotherapie van kanker in het hoofd-halsgebied

Rietberg, Martinus

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1972

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Rietberg, M. (1972). *Methotrexate en radiotherapie. Een onderzoek naar de mogelijkheden van orale of intraveneuze toediening van methotrexate bij de radiotherapie van kanker in het hoofd-halsgebied*. [, Rijksuniversiteit Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

M.RIETBERG METHOTREXATE EN RADIOTHERAPIE



Methotrexate en radiotherapie

Stellingen

1. Bij de behandeling van gestenoseerde bloedvaten in het aorto-iliacale traject verdient de „desobstruktie” de voorkeur boven het aanbrengen van alloplastisch materiaal.
2. De prognose van letsels bij ongevalspatienten kan worden verbeterd door eerste opvang en behandeling in speciaal daartoe ingerichte lokaliteiten van ziekenhuizen te laten geschieden.
3. Bij de diagnostiek en chirurgische behandeling van het aneurysma aortae abdominalis is aortografie slechts zelden nodig.
4. Thrombosering tengevolge van hypotensie van een externe arterio-veneuze shunt bij chronische dialysepatienten, dient in eerste instantie met lokale toediening van streptokinase behandeld te worden.
5. Indien de verdenking op penicilline-allergie bestaat, dient een plakproef aan „scratch”- en intracutane testen vooraf te gaan.

Der Hautarzt 1971:18

6. Het is zinvol onderscheid te maken tussen anorexia nervosa en anorexia mentalis.

Ned. Tijdschr. v. Psych. 1966:161

7. Ook bij een lege artis uitgevoerde bronchoscopie moet rekening gehouden worden met een gestoorde „mucus-clearance” en een verhoogde infectiekans gedurende een week na de ingreep.
8. Het effect van medikamenten op de visco-elastischeit van bronchus-secreet kan alleen juist beoordeeld worden, indien enkele „dag-curves” vergeleken worden.
9. Bij de diagnostiek van femurfracturen dient als routine ook een bekkenoverzichtsfoto vervaardigd te worden.

10. Het is de vraag of het gebruik, om pasgeborenen gedurende de eerste levensdagen te laten hongeren en dorsten, wel juist is.
11. Bij de introductie van het begrip „Mol” in de gangbare studieboeken voor het middelbaar onderwijs wordt onvoldoende aandacht geschonken aan de wezenlijke inhoud van dit begrip.
12. Er lijkt thans een analogie te bestaan met de situatie in 1694 toen, wegens de vorm van de promotie aan de Universiteit van Groningen, het doctoraat van Hendrik van Deventer door het Haagse Bestuur niet werd erkend.

Stellingen behorende bij: M. Rietberg, Methotrexate en radiotherapie,
Groningen 1972

RIJKSUNIVERSITEIT TE GRONINGEN

Methotrexate en radiotherapie

Een onderzoek naar de mogelijkheden van
orale of intraveneuze toediening van
methotrexate bij de radiotherapie van
kanker in het hoofd-halsgebied

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de geneeskunde
aan de Rijksuniversiteit te Groningen
op gezag van de Rector Magnificus Dr. A. Wattel
in het openbaar te verdedigen op
woensdag 15 maart 1972 des namiddags te 4 uur door

MARTINUS RIETBERG

geboren te 's Hertogenbosch

Te Assen bij

Van Gorcum & Comp. n.v. - Dr. H. J. Prakke & H. M. G. Prakke

PROMOTORES: PROF. DR. H. C. STAM
PROF. DR. J. OLDHOFF

*Aan Terry en
onze zonen Peter
Marc
Edwin
Allard-Martin*

Woord vooraf

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de welkome gelegenheid velen dank te zeggen.

In het bijzonder gaan mijn gedachten uit naar mijn ouders, van wie helaas mijn vader deze dag niet meer heeft mogen meemaken.

Aan allen die onder Uw bekwame leiding, hooggeleerde Kuijjer en zeergeleerde van de Stadt, hebben bijgedragen aan mijn vorming tot chirurg, houd ik dankbare herinneringen.

Hooggeleerde Stam, beste Coen. De wijze waarop je mij bij de bewerking van dit onderwerp hebt begeleid, dwingt mijn diepste respect af. Je gedegen kennis en enthousiaste hulp waren voor mij van onschatbare waarde. Aan deze samenwerking zal ik vele goede herinneringen blijven bewaren. Het verheugt mij zeer dat je mijn promotor wilt zijn.

Hooggeleerde Oldhoff, beste Jan. Op de dag dat ik bij je kwam om over dit onderwerp te praten, kon ik niet bevroeden dat dit het uiteindelijke resultaat zou worden. Jouw waardevolle opmerkingen en adviezen heb ik buitengewoon gewaardeerd. Dat ook jij mijn promotor wilt zijn, stel ik zeer op prijs.

Hooggeleerde Lammers en hooggeleerde Lamberts. Ik ben U zeer erkentelijk voor de kritische en prettige wijze waarop U een bepaald onderdeel van het manuscript met mij hebt willen doornemen. Uw commentaar is het geheel zeer ten goede gekomen.

Geachte mejuffrouw Smaal, geachte mevrouw Wayer-Bos, geachte heer Siks. Uw bemoeienissen met taal en vormgeving van het uiteindelijke boekje hebben duidelijk resultaat gehad. Heel hartelijk dank.

Mijn lieve Terry. De afgelopen tijd is voor jou niet gemakkelijk geweest. Veel tijd en aandacht heb ik aan ons gezin ontnomen. De wijze waarop je dit alles hebt opgevangen, vervult mij met diepe trots.

Inhoud

Inleiding	Behandeling met cytostatica bij kanker	1
Hoofdstuk I	De foliumzuurantagonisten	3
Hoofdstuk II	De eigenschappen van methotrexate (4-amino-N ¹⁰ -methylfoliumzuur; amethoptherine; MTX; ledertrexate)	6
	1. Werking	6
	2. Farmacokinetiek	8
	3. Toxicologie	12
Hoofdstuk III	Het gebruik van methotrexate ter behandeling van patienten met kanker	18
	1. Klinische resultaten van oraal of intraveneus toegediend methotrexate alleen	18
	2. Experimenteel onderzoek betreffende kombi- natie van methotrexate met radiotherapie	21
Hoofdstuk IV	De orale toediening van methotrexate gekombi- neerd met radiotherapie bij kanker in het hoofd- halsgebied	27
	1. Gegevens verzameld uit de literatuur	27
	2. Beschouwingen over deze literatuurgegevens	34
Hoofdstuk V	De eigen methode van behandeling	39
Hoofdstuk VI	Bewerking van de gegevens verkregen bij 33 pa- tienten behandeld tussen 1964 en 1969	42
	A. Samenstelling van de groep van 33 patienten:	42
	1. Geslachtsverdeling	42

2. Leeftijdsverdeling	42
3. Verdeling naar tumorlokalisatie en pathologisch-anatomische diagnose	43
4. Vorm van therapie voorafgaande aan de combinatietherapie	43
B. Waarnemingen bij controle van de groep minstens twee jaar na behandeling van de laatste patient	44
1. Toxische verschijnselen	44
2. Overleving	45
3. Het lokale behandelingsresultaat	47
C. Enkele illustratieve gevallen	52
1. Met pathologisch-anatomisch onderzoek van het behandelde gebied (4 patienten)	52
2. Met langdurige overleving (2 patienten)	61
Hoofdstuk VII Konklusies en suggesties	70
Hoofdstuk VIII Conclusions and suggestions.	73
Literatuur	76

Inleiding: Behandeling met cytostatica bij kanker

Cytostatica, stoffen die de groei van cellen remmen, werden ontwikkeld na de ontdekking dat door toediening van stikstofmosterdgas aan proefdieren het aantal leukocyten daalde. In 1942 werd deze stof voor het eerst toegepast bij een patient die aan lymfosarcoom leed. Sederdien zijn vele nieuwe cytostatica ontwikkeld, die onderling verschillen in hun werkingsmechanisme, zodat een groepering naar dit mechanisme gerechtvaardigd is.

Methotrexate, dat het onderwerp van deze studie is, behoort tot de groep van de antimetabolieten. Deze stoffen hebben de eigenschap dat zij door hun grote chemische gelijkheid de plaats van een essentiële metaboliet in de stofwisseling innemen. Daar zij de karakteristieke eigenschap van de metaboliet missen, worden bepaalde reactiestadia in de stofwisseling geblokkeerd. Binnen de groep van deze anti-metabolieten onderscheidt men antagonisten van foliumzuur, van purine-derivaten, van pyrimidine-derivaten en van glutaminezuur en andere aminozuren. De antimetabole werking van methotrexate wordt door interventie in de foliumzuurstofwisseling veroorzaakt. Hierop zal in hoofdstuk II nader worden ingegaan.

Uit experimenteel en klinisch onderzoek bleek dat methotrexate, binnen de groep van foliumzuurantagonisten, een minder toxische werking bezit dan andere preparaten. Hierdoor nam klinische toepassing van dit preparaat bij kanker een grote vlucht. Vele verschillende schema's worden toegepast voor orale en intraveneuze toediening en voor intra-arteriële infusietechnieken.

De uiteindelijke resultaten, verkregen bij toepassing van cytostatica alleen, waren teleurstellend. Men heeft dan ook getracht door combinatie met andere vormen van kankertherapie betere resultaten te verkrijgen. Op één van deze combinaties, namelijk die van oraal toegediend methotrexate en radiotherapie – al of niet voorafgegaan of gevolgd door chirurgische therapie – zal in de volgende hoofdstukken nader worden ingegaan. De eenvoud van de orale toedieningsvorm van het methotrexate is gekozen boven de technisch moeilijke en tijdrovende methode der intra-arteriële infusie (snow, 1971). Deze laatstgenoemde methodiek zal niet verder aan de orde komen.

Het doel van dit proefschrift is het evalueren van de ervaringen

elders en in de Chirurgische Universiteitskliniek te Groningen om richtlijnen aan te kunnen geven voor optimale klinische toepassing. Daartoe werd, na bestudering van de beschikbare literatuur, bij 33 patienten, lijdende aan kanker in het hoofd-halsgebied, die met methotrexate en radiotherapie werden behandeld, een na-onderzoek gedaan. Dit onderzoek werd 2 jaar na behandeling van de laatste patient afgesloten. Een dergelijk onderzoek heeft geen statistische bewijskracht. Echter kan een nauwkeurig analyseren van de verschijnselen onder deze therapie, zowel bij de patient als van de tumor, belangrijke informatie opleveren voor het verbeteren van deze behandeling.

De ontdekking van het mechanisme van de antibakteriële werking van sulfanilamiden is een grote stimulans geweest tot de ontwikkeling van de chemotherapie in het algemeen en van antimetabolieten in het bijzonder. Foliumzuur, voor de groei noodzakelijk, wordt in de bacterie gevormd mede uit para-aminobenzoëzuur; sulfanilamide blokkeert deze synthese. Bij de mens wordt het foliumzuur met het voedsel opgenomen. Een gevolg hiervan is dat sulfanilamide, bij de mens gegeven, de bacteriegroei remt en de gastheer ongemoeid laat. De werking van het sulfanilamide berust op het feit, dat het ten opzichte van para-aminobenzoëzuur een zekere structurele verwantschap heeft, waardoor het bij metabole processen de plaats van het para-aminobenzoëzuur inneemt; de structuur verschilt echter zoveel, dat het niet de functie ervan overneemt (WOODS 1940; JUKES en BROQUIST 1961). Men noemt dit een kompetitief antagonisme en men noemt de stof een antimetaboliet.

Een tweede belangrijke ontdekking was de functie van het foliumzuur. De invloed van deze stof op de bloedvorming was er de aanleiding toe om deze stof in verband te brengen met de groei van alle weefsels. Aan foliumzuur verwante stoffen zouden dan als antimetaboliet de groei kunnen remmen. Bij experimenteel onderzoek vonden LEWISOHN en LEUCHTENBERGER in 1946 inderdaad dat aan foliumzuur verwante stoffen bij vrouwelijke Rockland-muizen met „Sarcoom 180” de groei hiervan remmen. Na toedienen van deze stoffen aan 28 muizen met mammacarcinoom ontstond bij 11 dieren een totale regressie van de tumor.

Toen de structuur van het foliumzuur bekend was geworden (fig. 1), waarbij bleek dat het molecuul bestond uit een pteridine-, een para-aminobenzoëzuur- en een glutaminezuurgedeelte, was de weg geopend chemisch analoge verbindingen van het foliumzuur te maken en deze op antimetabole werking te onderzoeken. In 1947 verscheen hierover een publikatie van FRANKLIN, STOKSTADT, BELT en JUKES. Zij beschreven een stof genaamd „X-methyl-foliumzuur”, die bij ratten een zeer duidelijke leukopenie veroorzaakt. De „X” in de formule gaf aan, dat de structuur nog niet geheel was opgehelderd, doch dat de belangrijkste component het methyl-foliumzuur was.

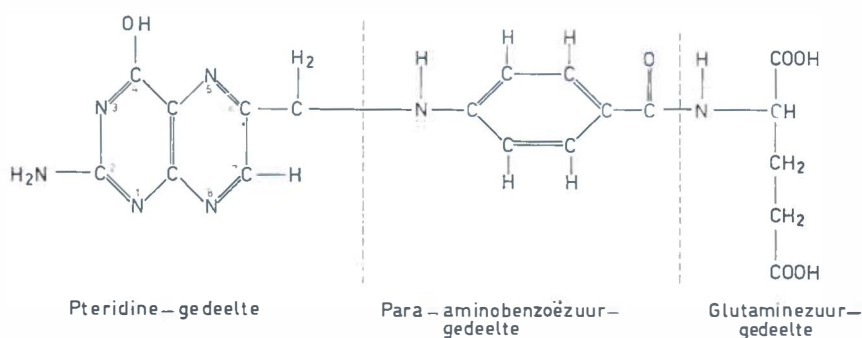


Fig. 1. Strukturformule van foliumzuur.

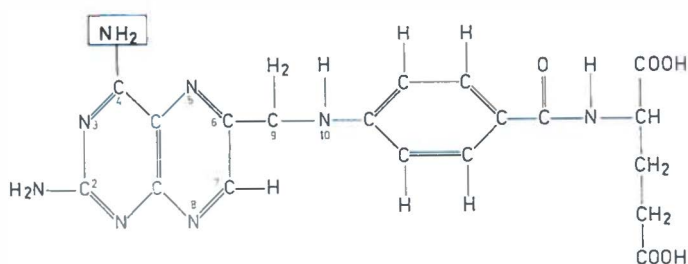


Fig. 2. Strukturformule van aminoptherine. De OH-groep op de C4-plaats van foliumzuur is door een NH_2 -groep vervangen.

Nog in hetzelfde jaar verscheen de publikatie van SEEGER, SMITH en HULTQUIST (1947) over de synthese van een nieuw foliumzuurderivaat, namelijk 4-aminofoliumzuur („aminoptherine”: fig. 2). Deze stof bleek de groei van het „Rous-sarcoom” bij jonge kuikens te remmen. De dosis, voldoende om na enting van tumor uitgroei te voorkomen, bleek echter ook de kuikens te doden (LITTLE, SAMPATH, SUBBAROW 1948).

Een belangrijk evenement was de voordracht van FARBER, DIAMOND, MERCER, SYLVESTER en WOLFF te Boston in 1948. Bij de behandeling van kinderen met akute leukaemie was gebleken, dat enkele reeds bekende foliumzuurantagonisten, zoals diopterine, weinig effect hebben. Bij het zoeken naar nieuwe, beter werkende foliumzuurderivaten, was het toen juist bekende aminoptherine (fig. 2) gebruikt. Van 16 kinderen, lijdende aan akute leukaemie en behandeld met intramuskulaire injecties van aminoptherine, kregen 10 patientjes een remissie van tenminste drie maanden; het resultaat bij de overige zes kinderen was niet gunstig. Het aminoptherine bleek bij deze klinische toepassing zeer toxisch te zijn.

Getracht werd andere derivaten te synthetiseren, die minder toxische eigenschappen hadden. ANGIER en medewerkers hadden reeds in 1946 een methode aangegeven tot de bereiding van het 4-amino-N¹⁰-methyl-foliumzuur, kortweg „amethopterie”, later „methotrexate” (fig. 3) genoemd.

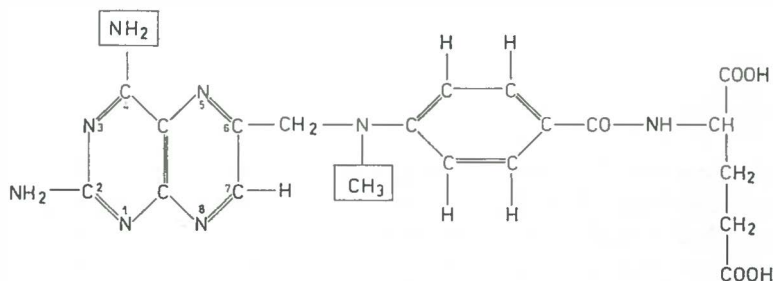


Fig. 3. Struktuurformule van amethopterie (methotrexate). Het H-atoom op de N10-plaats van aminopterie is door een CH₃-groep vervangen.

MARTIN, TOLMAN, MOSS (1947) en FRANKLIN, BELT, STOKSTADT en JUKES (1949) publiceerden artikelen over de toepassing van amethopterie op ratten en kuikens. Hierbij bleek dat de rat en het kuiken minder toxische verschijnselen tonen dan bij toediening van aminopterie. FERGUSON (1950) noemde zelfs een toxiciteit die 1/10 bedraagt van die van het aminopterie, waargenomen bij proeven met honden, ratten en muizen. FRANKLIN c.s. voegden deze stof ook toe aan een kultuur van streptococcus faecalis. Het effect op de groei van deze streptococci leverde echter geen verschil op tussen amethopterie en aminopterie.

Op grond van de gunstiger resultaten bij de experimentele toepassing werd geleidelijk het methotrexate voor klinisch gebruik geïntroduceerd.

De eigenschappen van methotrexate (4-amino-N¹⁰-methylfoliumzuur; amethopterie; MTX; ledertrexate)

Hoofdstuk II

1. *Werking*

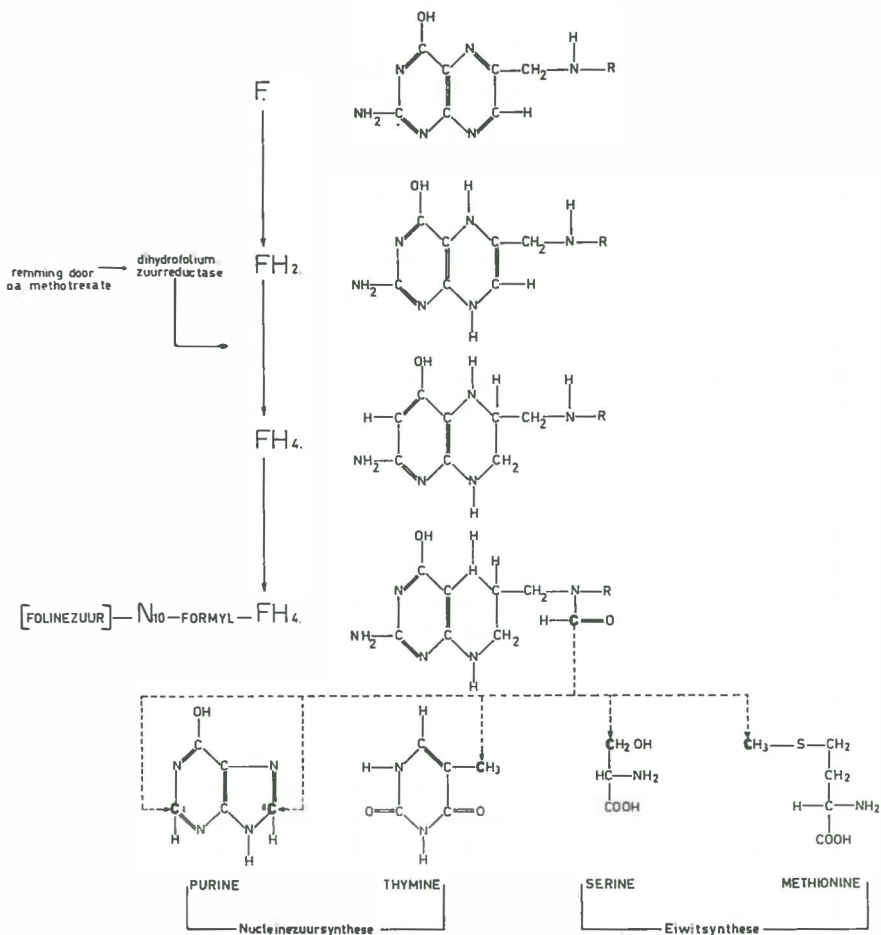
De werking van deze stof is een gevolg van het effect op de foliumzuurstofwisseling. Foliumzuur wordt met behulp van enzymen via 7,8-dihydrofoliumzuur gereduceerd tot 5, 6, 7, 8-tetrahydrofoliumzuur. Deze laatste stap geschiedt met behulp van het enzym dihydrofoliumzuurreduktase. Het tetrahydrofoliumzuur wordt dan weer omgezet tot N¹⁰-formyltetrahydrofoliumzuur, waarbij zich aan het N¹⁰-atoom een C = O-groep bevindt. Dit N¹⁰-formyltetrahydrofoliumzuur is het

H
uitgangspunt van een reeks reacties, die bekend staat onder de naam „one-carbon group transport”. De bovengenoemde formylgroep levert namelijk de C-atomen voor de synthese van het inosinezuur, de „precursor” van de purinenucleotiden, het thymine, serine en methionine.

De purinebasen en het thymine zijn essentiële bouwstenen voor de vorming van desoxyribonucleïnezuur. Het serine en methionine zijn onder meer belangrijk voor de eiwitsynthese. Het tetrahydrofoliumzuur wordt aan het einde van de reaktieketen weer in zijn oorspronkelijke staat teruggevormd, waarmee de cyclus is gesloten. In schema 1 wordt de foliumzuurstofwisseling weergegeven (voorzover van belang in verband met de remming door methotrexate).

Zowel FRANKLIN c.s. (1949) als SEEGER c.s. (1949) was het opgevallen, dat foliumzuur slechts in zeer hoge concentraties enigermate in staat is de toxische werking van methotrexate tegen te gaan. Maar BURCHENAL, BABCOCK, BROQUIST en JUKES (1951) toonden aan, dat N⁵-formyltetrahydrofoliumzuur (folinezuur; synthetische vorm: leukovorin; biologische vorm: citrovorumfaktor) de antileukaemische effecten van methotrexate wèl tegengaat of teniet doet. De citrovorumfaktor ontleent zijn naam aan het feit, dat de stof noodzakelijk is voor de groei van *bacillus leukonostoc citrovorum* (SAUBERLICH en BAUMANN 1948).

Het was merkwaardig dat de toxische werking van foliumzuur-antagonisten zo slecht op foliumzuurtoediening reageerde, terwijl een tetrahydrofoliumzuurderivaat een veel betere antitoxische werking bezat. FOUNTAIN en medewerkers (1953) hielpen mee aan de oplossing



Schema 1. Foliumzuurstofwisseling met de 1 - koolstoffragmentoverdracht in de verschillende metabolieten.

F = foliumzuur; FH₂ = dihydrofoliumzuur; FH₄ = tetrahydrofoliumzuur; C-N-CH-CH₂-CH₂-COOH.

R = $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ || \quad | \quad | \\ \text{H} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} \\ | \quad | \quad | \\ \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{COOH} \end{array}$

van dit probleem. Zij vonden, dat ingespoten methotrexate nog tot ongeveer 8 maanden aantoonbaar is in lever- en nierweefsel van muizen. Zij suggereerden, dat deze retentie het gevolg is van een binding van het preparaat aan een enzym, dat hierdoor geblokkeerd wordt. Dit enzym zou dan zeer wel betrokken kunnen zijn bij de omzetting van foliumzuur naar tetrahydrofoliumzuur. Het was WERKHEISER (1961), die vermeldde dat het dihydrofoliumzuurreduktase een buitengewoon

sterke affiniteit heeft tot het methotrexate. Hij toonde aan, dat deze affiniteit 100.000 keer groter is dan de affiniteit van het dihydrofoliumzuurreduktase tot het dihydrofoliumzuur. Het gevolg is, dat door de aanwezigheid van zeer geringe hoeveelheden methotrexate, ook bij grote hoeveelheden foliumzuur, toch een remming in de foliumzuurcyclus optreedt. Het verklaart nu ook, waarom de toxische gevolgen van methotrexate door N⁵-formyltetrahydrofoliumzuur tegengegaan kunnen worden. Folinezuur wordt namelijk zonder dihydrofoliumzuurreduktase in het organisme omgezet in N¹⁰-formyltetrahydrofoliumzuur, één der essentiële reactieprodukten in de normale foliumzuurstofwisseling, waarvan de vorming door methotrexate geremd wordt (zie schema 1).

Het methotrexate is tot op heden een van de best klinisch toepasbare antimetaboliëten van het foliumzuur gebleven.

2. *Farmacokinetiek*

Gezien het gunstige klinische effect van methotrexate bleef farmacokinetisch onderzoek niet uit. In 1951 gaven BURCHENAL en medewerkers een eenvoudige methode aan om methotrexatespiegels in bloed en urine te bepalen. Zij vergeleken de groeiremming op streptococcus faecalis van een onbekende concentratie met die van verschillende bekende oplossingen van methotrexate. Deze techniek wordt in ongeveer dezelfde vorm o.a. bij de bepaling van de concentratie van penicilline en streptomycine gebruikt. Aanvankelijk werden met deze methode fouten gemeten tot $\pm 12\%$, welke na enige ervaring aanzienlijk konden worden verminderd. Bepalingen met deze techniek werden bij 6 vrijwilligers toegepast. Het bleek dat methotrexate bij nuchtere personen 15-30 minuten na orale toediening in aantoonbare hoeveelheden in bloed en urine aanwezig was. Bij niet-nuchtere personen bedroeg deze tijd 30-60 minuten. De stof was soms nog 6 uur na toediening in bloed en urine aantoonbaar, maar niet meer na 24 uur. In 24 uur werd door deze 6 proefpersonen 40-57% van de toegediende stof met de urine uitgescheiden. Er bleek geen verschil tussen orale en intramusculaire toedieningswijze. Indien er een nierfunctiestoornis aanwezig was, bleek het methotrexate na 48 uur nog aantoonbaar in bloed en urine te zijn. Eén probleem waar BURCHENAL en medewerkers mee kampten, was de onzekerheid of de werkzaamheid door het onveranderde methotrexate of door het één of andere omzettingsprodukt veroorzaakt werd. FOUNTAIN en medewerkers (1953) toonden met behulp van papierchromatografie aan, dat methotrexate onveranderd met urine wordt uitgescheiden.

Ook bij de vele dierproeven bleek dat er, wat betreft de serum- en urineconcentraties, geen verschil bestond tussen de orale en intraveneuze toedieningsweg. Bij muizen daalt 30 minuten na intraveneuze

toediening het methotrexategehalte in het serum zeer snel, maar de stof wordt door lever, milt en nier zeer lange tijd gereteneerd (FOUNTAIN e.a. 1952, 1953).

In 1962 publiceerden LIGUORI en medewerkers een onderzoek, waarbij het gehalte aan methotrexate in serum, urine en weefsel wordt bepaald. De patienten, die voor dit onderzoek werden gekozen, waren lijdende aan een zeer ver voortgeschreden vorm van kanker met een normale nierfunctie. Leukaemische patienten werden voor dit onderzoek uitgesloten. Na één enkele intraveneuze injectie blijkt, dat de hoogste serumconcentratie na 30 minuten wordt bereikt. Na 1 uur daalt de serumconcentratie snel en na 24 uur kan praktisch geen methotrexate meer worden aangetoond. In de urine wordt in de eerste 8 uur 78%, in de laatste 16 uur 22% van de totale, via de urine uitgescheiden, hoeveelheid methotrexate gevonden. Deze totale hoeveelheid blijkt gemiddeld \pm 57% van de toegediende dosis te zijn. De weefselconcentratie na 5 uur is veel hoger dan die na 10 of 12 uur.

Op het in 1962 in Engeland gehouden 1e symposium over het gebruik van methotrexate bij de behandeling van kanker, hield Marion FREEMAN-NARROD een lezing over de farmacologie van methotrexate. Als één van de eerste auteurs ging zij ook wat uitvoeriger in op de orale toedieningswijze. Zij vond bij orale toediening aan gezonde mensen, dat de stof snel wordt geresorbeerd. Binnen een half uur verschijnt het in de bloedbaan, waarbij na 1-2 uur de hoogste concentratie bereikt wordt. Daarna verdwijnt het snel, zodat na 4-6 uur geen duidelijke spiegel meer aantoonbaar is. Wat betreft de intraveneuze toediening kwam zij tot dezelfde resultaten als FOUNTAIN en LIGUORI. Ook bestudeerde zij de resorptie van de stof indien deze oraal aan leukaemische patienten wordt toegediend. Zij kwam hierbij tot interessante waarnemingen. Bij een 18-tal van deze patienten zag zij twee soorten resorptiepatronen. De eerste groep patienten, 13 in getal, liet na 1 uur een hoge serumspiegel zien (gemiddeld 400 μg per ml), maar na 4 uur was nauwelijks nog een spiegel aantoonbaar. De tweede groep (de overige 5 patienten) resorbeerde de stof veel langzamer. Na 1 uur was de gemiddelde concentratie 50 μg per ml serum, doch na 4 uur was nog een duidelijke spiegel aanwezig van 100 μg per ml serum. Alle patienten kregen gedurende enige weken oraal methotrexate toegediend. Na deze tijd bleek, dat 9 van de 13 oorspronkelijk snel methotrexate-resorberende patienten overgegaan waren naar het langzaam resorberende type. Van de oorspronkelijke 18 patienten hadden na enige weken 14 patienten het langzame type van resorptie. Tevens kwam naar voren, dat zich bij 13 van deze 14 patienten toxische verschijnselen voordeden, wat bij de 5 patienten van het snel resorberende type niet het geval was. Om deze waarneming te controleren, bepaalde zij de plasmakoncentratiecurve na orale toediening van methotrexate bij 4 leukaemische patienten, die toxische verschijnselen hadden ten

gevolge van therapie met methotrexate. Ook bepaalde zij dezelfde curve bij 4 niet-toxisch reagerende patienten. Zeer duidelijk bleek, dat de toxisch reagerende patienten allen een langzame methotrexate-resorptie hadden in tegenstelling tot de niet-toxisch reagerende patienten. Diende men de stof intraveneus toe, dan toonden beide groepen dezelfde curve, namelijk die van het snel resorberende type. Werd nu de stof aan de toxisch reagerende patienten verder intraveneus gegeven, dan werd het middel goed verdragen.

Deze waarnemingen leidden tot de konklusie, dat toxiciteit afhankelijk is van de tijdsduur waarin de stof zich in de bloedstroom bevindt. Waarschijnlijk zijn de veranderde resorptiepatronen voor een groot deel het gevolg van de toxische invloed van methotrexate op het darmepitheel. Bij intraveneuze toediening heeft men niet te maken met deze darmresorptie, zodat een andere toxische reactie te verwachten is. Helaas ontbreekt bij deze experimenten de korrelatie tussen het resorptiepatroon (en daarmee de toxiciteit) en het antileukaemische effect.

Een uitvoerige farmacologische bijdrage leverden ZUREK en medewerkers (1968). Zij bestudeerden de farmacologische eigenschappen bij 216 niet-leukaemische kankerpatienten met een normale nierfunctie. De reden van dit onderzoek was het goede klinische resultaat bij continue intravasale en orale (SULLIVAN, MILLER 1962; SULLIVAN e.a. 1967) toediening van methotrexate. De bovengenoemde 216 patienten werden in 2 hoofdgroepen verdeeld. Groep I kreeg de stof éénmaal intra-arteriëel, intraveneus of peroraal toegediend. Aan groep II werd de stof over een wat langere tijd gegeven, ook weer via de intra-arteriële, intraveneuze of perorale weg. In groep I varieerde de toegediende dosis methotrexate van 0,01-0,70 mg per kg lichaamsgewicht, in groep II bedroeg dit 0,07-0,70 mg per kg lichaamsgewicht per 24 uur. Na 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 en 96 uur werd het methotrexate-gehalte in bloed en urine bepaald. In groep II werd de stof toegediend, totdat een milde vorm van toxiciteit optrad.

Over het algemeen werden in groep I, waarbij de stof slechts éénmaal werd gegeven, de hoogste waarden in het serum één tot twee uur na toediening gevonden. Daarna namen de serumspiegels snel af tot waarden beneden 25 μg per ml na 24 uur. De verhouding van de gevonden serumspiegel tot de gegeven dosis is niet geheel evenredig; wel worden hogere doses gevolgd door hogere serumspiegels. Alleen door het methotrexate radio-actief te merken, kon dit nog 2-3 weken in zeer lage waarden in het serum aangetoond worden. Er werden geen significante verschillen tussen intra-arteriële en intraveneuze toediening gevonden. Het bleek dat $\pm 65\%$ van de gegeven dosis na 4 uur met de urine werd uitgescheiden, na 24 uur bleek deze waarde tot $\pm 90\%$ te zijn gestegen. (Deze waarden zijn in tegenspraak met die vermeld op blz. 8. Waarschijnlijk is een onnauwkeuriger bepalingss-

methodiek hiervoor verantwoordelijk). Met één enkele gift per os bleek de hoogste serumwaarde na 2-4 uur bereikt te worden, doch deze lag gemiddeld $\pm 20\%$ lager dan na één enkele intraveneuze injectie. Ook de uitscheiding met de urine bleek $\pm 20\%$ minder te zijn dan bij de intraveneuze route (fig. 4).

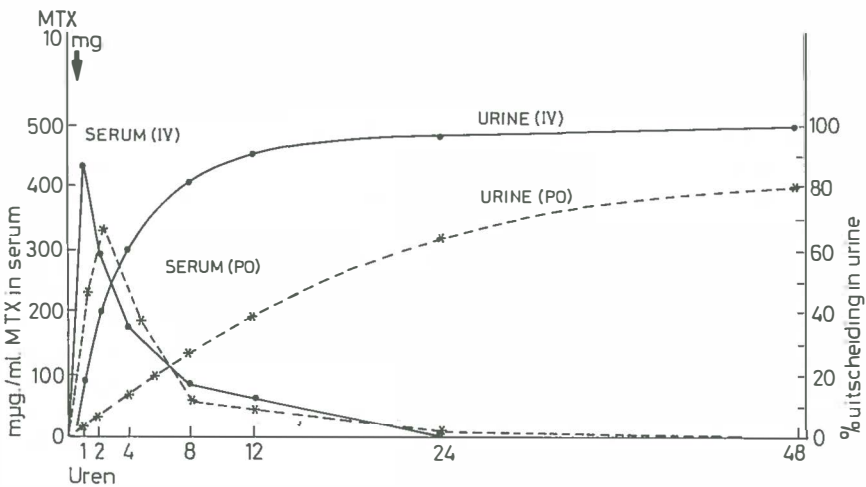


Fig. 4. Serumspiegels en uitscheiding in de urine van methotrexate bij eenzelfde patient na één intraveneuze (—) of orale (---) gift. (Zurek et al. 1968).

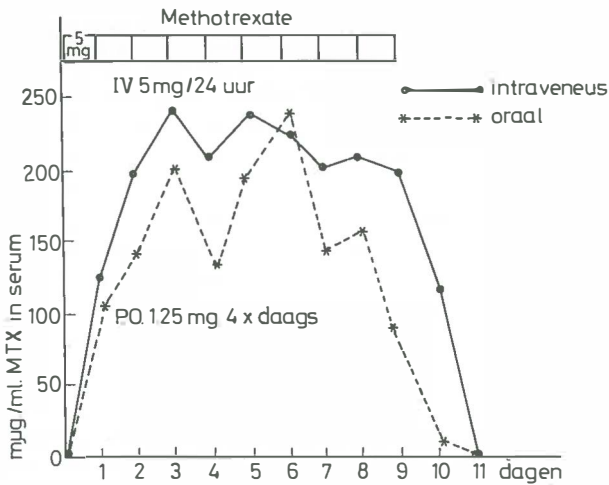


Fig. 5. Serumspiegels van methotrexate bij voortgezette intraveneuze (—) of orale (---) toediening. (Zurek et al. 1968).

Bij de patienten uit groep II, die de stof gedurende langere tijd intra-arteriëel toegediend kregen, werd na 2-3 dagen een praktisch konstante serumconcentratie gevonden. Deze concentratie bedroeg gemiddeld 260 $\mu\text{g/ml}$ bij toediening van 5 mg per 24 uur. Na het staken van het methotrexate daalde de serumconcentratie snel, zodat na 2-3 dagen geen stof meer kon worden aangetoond. Na deze 3 dagen was $\pm 90\%$ van de totaal gegeven dosis met de urine uitgescheiden. Bij continue intraveneuze toediening werden geen verschillen waargenomen ten opzichte van de intra-arteriële toedieningswijze. Bij de orale toedieningswijze ontvingen de patienten 4 keer daags 1,25 mg. Over het algemeen bleven de concentraties in serum en urine iets lager dan bij intraveneuze toediening (fig. 5). Het bleek dat 60-70% van de totale dosis weer werd uitgescheiden. Dit verschil kan mogelijk verklaard worden door het feit dat de gegeven methotrexate-dosis niet volledig is geresorbeerd.

Uit deze studie blijkt, dat peroraal gegeven methotrexate bruikbare spiegels geeft voor klinische toepassing. Dit is echter enigszins in tegenspraak met de waarnemingen van Marion FREEMAN-NARROD (blz. 9) die tijdens perorale toediening van methotrexate verschillende resorptiepatronen zag. Zoals reeds opgemerkt werd, zullen deze verschijnselen voor een groot deel op toxische reactie van het darmepitheel terug te voeren zijn. Een praktische konsekwentie is, dat perorale toediening van methotrexate voor poliklinisch gebruik niet optimaal, doch wel verantwoord is.

Het is duidelijk dat tijdens de behandeling van methotrexate de serumconcentratie een belangrijke faktor is. Echter van evenveel belang is de diffusie in het weefsel. Een goede indruk van deze weefselconcentratie krijgen we uit de mededeling van SULLIVAN en OBERFIELD (1969). Tijdens intraveneuze behandeling met methotrexate werden de concentraties in serum, vulvatumor, huid en beenmerg bepaald (fig. 6). Bij een maximale serumconcentratie van 150-200 μg bleken vulvatumor en huid een concentratie van 50-100 μg methotrexate te hebben. Figuur 7 vermeldt de concentraties methotrexate in de verschillende weefselsoorten, ook weer na één enkele intraveneuze injectie. Hierbij valt op, dat in de meeste weefsels een zeer aanvaardbare concentratie bereikt wordt. Aan het eind van hoofdstuk III wordt hierop teruggekomen.

3. *Toxicologie*

De toxische verschijnselen bij de toepassing van het preparaat methotrexate zijn een gevolg van de invloed van deze stof op de cel. Het is zonder meer waarschijnlijk dat cellen met een intensieve foliumzuurstofwisseling, dus sneldelende cellen, de sterkste invloed ondervinden. Tot deze groep behoren onder andere het beenmerg en het darmepitheel.

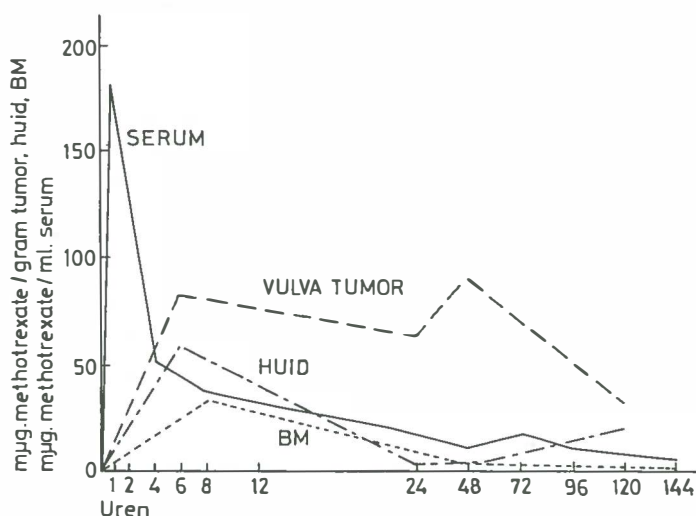


Fig. 6. Koncentraties van gemerkt methotrexate in serum, vulvatumor, huid en beenmerg na éénmalige intraveneuze toediening bij eenzelfde patient (SULLIVAN en OBERFIELD 1969).

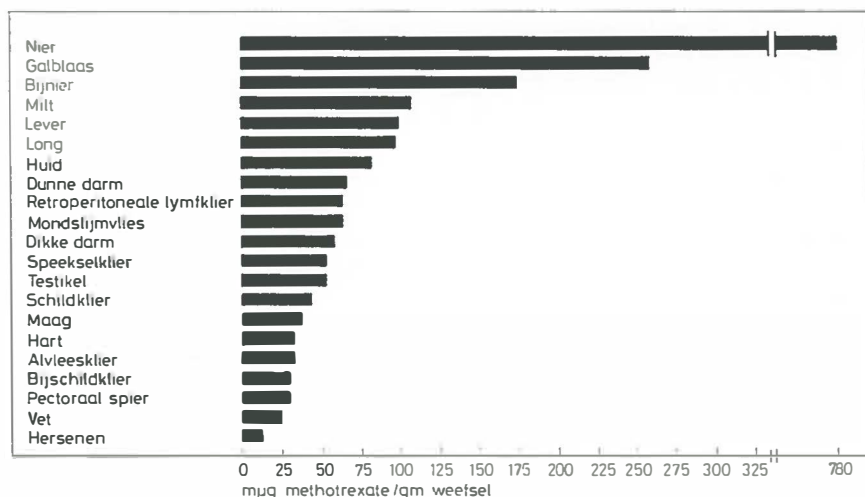


Fig. 7. Koncentraties van methotrexate in diverse weefselsoorten na éénmalige intraveneuze toediening bij eenzelfde patient (SULLIVAN en OBERFIELD 1969).

Reeds voor de klinische toepassing van het preparaat aminopterie door FARBER en medewerkers in 1948, was men door middel van dierexperimenten al op de hoogte van de toxiciteit der foliumzuur-antagonisten. FRANKLIN, STOKSTADT (1947) en later HIGGINS (1949)

zagen bij toediening van aminopterine aan ratten eerst leukopenie optreden, later gepaard gaande met anaemie, hypoplastisch beenmerg, hyperplasie van de bijniere, atrofie en fibrosis van de thymus en milt, gewichtsverlies, anorexie en diarree. Bij muizen en kuikens werden praktisch dezelfde verschijnselen waargenomen: leukopenie, anaemie en veranderingen van het beenmerg. Hierin verschenen grote myeloide cellen (STOKSTADT, FRANKLIN 1947; BASERGA en MARINONE 1949). Bij varkens zag men leukopenie, anaemie en een duidelijk veranderd beenmerg: afname van granulocyten en toename van myeloide cellen en jeugdvormen van erythrocyten. Tevens werden in het beenmerg megakaryoblast-achtige cellen aangetroffen (CARTWRIGHT 1948, WELCH 1947, INNES 1949). Bij honden werd ook leukopenie gezien, gepaard gaande met haaruitval, pruritus, dermatitis en ulceraties van de huid (THIERSCH 1949; FRANKLIN 1949).

Op het in 1966 te Bristol gehouden 2e symposium over de toediening van methotrexate bij kanker, ging JACOBSON nader in op het ontstaan van toxische verschijnselen. Hij had normale en leukaemische muizen met 1 mg aminopterine (een veel hogere dosis dan therapeutisch gebruikt wordt) ingespoten. Binnen 2 uur waren in het beenmerg al duidelijke veranderingen zichtbaar. Het aantal cellen dat zich in de profase bevond, bleef onveranderd. Er was echter een duidelijke toename van het aantal cellen in de metafase. Daarentegen bleken de cellen in de anafase en de telofase duidelijk verminderd. Dit verschijnsel kan verklaard worden door remming van de overgang van metafase naar anafase door de foliumzuurantagonisten. Dit zou dan het gevolg zijn van een vertraging in de scheiding van de zich gedeeld hebbende chromosomen. Door deze eigenschap valt methotrexate ook in de groep van de metafaseremmers.

Behalve het beenmerg bleek ook het epitheel van mondholte en darmtractus zeer gevoelig voor het preparaat te zijn, wat samenhangt met het feit, dat de levensduur van deze cellen maar 2-4 dagen is. Om deze veranderingen in de darmtractus te vervolgen werden muizen gebruikt, die met 1 mg aminopterine werden ingespoten. Daarna werden de cellen uit de krypten van LIEBERKÜHN bestudeerd. Ook in deze cellen was na 2 uur al een duidelijke verandering te zien, namelijk een toeneming van het aantal cellen in de metafase. Na 4 uur was het beeld ongeveer hetzelfde, maar sommige van de cellen in de metafase vertoonden degeneratieve kenmerken of grotere nucleï. Na 3 dagen was het beeld totaal veranderd: de villi waren geschrompeld en bedekt met gezwollen epitheliale cellen. Op de 5e dag bleken de klieren gereduceerd in aantal en grootte met vele degeneraties in het restant van het epitheel. Grote gedeelten van de villi waren ontdaan van het epitheel en bedekt met een fibrinebeslag, waarin zich vele mikro-organismen bevonden. De muizen stierven tenslotte aan sepsis.

Bovengenoemde veranderingen in de cellen van de darmtractus

bij muizen bleken parallel te lopen met de door FARBER en medewerkers (1948) gevonden afwijkingen bij leukaemische patienten behandeld met aminopterine.

JACOBSON beproefde ook de invloed van aminopterine en methotrexate op weefselkultures van kippeembryo-osteoblasten en -fibroblasten. Hierbij bleek dat de cellen in de profase niet beïnvloed werden; binnen 2 minuten echter toonden de chromosomen van de cellen in de metafase een duidelijke „clumping”. De cellen in de anafase gingen normaal over in de telofase, waarna twee dochtercellen gevormd werden. Ook hier bleek, dat het aantal cellen in de anafase afgenomen was, terwijl het percentage cellen in de metafase gestegen was. Vermeldenswaard is verder nog, dat een zeer hoge dosis aminopterine of amethopterine weinig invloed had op cellen met een lange overlevingsduur, zoals die van lever, nier, spier en pancreas.

Wat betreft de toxische eigenschappen van het preparaat bij klinische toepassing op de patient komen geen essentiële verschillen ten opzichte van de experimenteel gevonden symptomen naar voren. Wel blijkt duidelijk uit de vele publikaties op dit gebied dat sommige cellen of organen eerder en sterker reageren dan andere. Laesies van het mondepitheel zijn meestal een vroeg symptoom van intoxicatie en kunnen zich al enkele dagen na het begin der therapie manifesteren. Er ontstaan pijnlijke, oppervlakkige ulcera aan lippen, binnenzijde der wangen, tong en uvula. Hierin kunnen zich, mede door de vaak verlaagde weerstand, vele soorten pathogene mikro-organismen ontwikkelen o.a. schimmels. De klinische uiting van intoxicatie kan zich verder voordoen als buikpijn, misselijkheid, braken of diarree, soms ontstaat een ernstig bloedverlies per anum als gevolg van ulceratie in de tractus digestivus. Tegelijkertijd ondergaat ook het beenmerg veranderingen. Het leukocyten- en thrombocytengetal in het perifere bloed tonen een grillig verloop met soms geleidelijke, soms zeer snelle daling tot zeer kritische waarden. Haemorrhagische diathese en koorts zijn hiervan een klinische uiting. Minder vaak voorkomende verschijnselen zijn haaruitval, balanitis, vulvitis, hyperpigmentatie, fotosensibiliteit van de huid, erytheem en leverfunctiestoornissen (vooral beschreven door auteurs in de dermatologische publikaties, waarbij methotrexate gebruikt wordt ter behandeling van psoriasis (RYAN e.a. 1964; SCOTT e.a. 1964). Om een indruk te krijgen van de percentages, waarin de verschillende uitingsvormen voorkomen, volgen de cijfers van SCHOENBACH, COLSKY en GREENSPAN (1952) bij perorale toediening van o.a. 5-25 mg methotrexate per dag: stomatitis (70%), gastro-intestinale verschijnselen (58%), leukopenie (58%), thrombopenie (32%), anaemie (32%), haaruitval (12%) en erytheem (6%). LEONE en medewerkers (1968) dienden éénmaal per week \pm 120 mg methotrexate intraveneus toe en zagen de volgende percentages: leukopenie (91%), stomatitis (69%), misselijkheid (37%), braken (34%), throm-

bocytopenie (34%) en anaemie (31%). Diarree, huidverschijnselen en oedeem van de oogleden kwamen in 3-11% van het aantal gevallen voor.

Een minder vaak voorkomende complicatie werd door CLARYSSE en medewerkers (1969) vermeld. Patienten lijdende aan akute lymfatische leukaemie werden met intermitterende doses methotrexate behandeld. Bij 7 patienten ontstonden progressieve, bilaterale, diffuse, interstitiële longinfiltraties. Een uit dit weefsel genomen biopsie toonde het beeld van een allergische granulomateuze pneumonie. Er kon geen virus of bacterie gekweekt worden. Het ziektebeloop was gunstig, onafhankelijk van het feit of het middel al dan niet gestaakt werd.

Een bijzondere toxische eigenschap van de foliumzuurantagonisten is de invloed op de embryogenese. THIERSCH en PHILIPS (1950) zagen bij toediening aan zwangere muizen en ratten van 0,15 mg methotrexate per kg lichaamsgewicht foetale dood optreden. De foeten toonden ernstige congenitale afwijkingen. Hoe jonger de graviditeit ten tijde van de toediening, des te ernstiger waren de afwijkingen. De zwangere dieren zelf toonden slechts een geringe beenmergdepressie. Klinisch werd eenzelfde soort reactie gezien. Bij een groep vrouwen die in aanmerking kwam voor therapeutische abortus, werd aminopterine gegeven. In vele gevallen bleek de vrucht afwijkingen te vertonen zoals hydrocephalus, meningo-encephalocèle en hazelip (GOODMAN en GILMAN 1970).

Konkluderend mogen we stellen dat methotrexate bij zwangerschap gecontraïndiceerd is. Indien er vitale indicatie bestaat om het preparaat bij een zwangere patiente toe te passen, moet een abortus overwogen worden.

Het is bekend, dat toxische verschijnselen van methotrexate eerder optreden bij een slechte nierfunctie. CONDIT, CHANES en JOEL (1969) beschreven toxische reacties op de nier zelf ten tijde van een behandeling met methotrexate. Aan 13 patienten met uitgebreide carcinomen werd methotrexate in een dosering van een $\frac{1}{2}$ tot 3 mg per kg lichaamsgewicht gegeven. De dosis werd om de 2 weken in één keer intraveneus toegediend. Alle patienten hadden voor de behandeling een goede nierfunctie. Het bleek dat bij 5 van de 13 patienten tijdens de behandeling duidelijke nierfunctiestoornissen optraden in de vorm van een verhoogd bloedureum en een gestoorde inuline- en p-aminohippuraat-clearance. Gewoonlijk liepen deze nierfunctiestoornissen parallel aan de daling van het aantal leukocyten in het perifere bloed. Bij sommige patienten traden al nierfunctiestoornissen op bij zeer geringe algemeen toxische verschijnselen. Pathologisch-anatomisch onderzoek van deze door methotrexate beschadigde nieren, toonde uitgebreide necrose van het tubulusepitheel.

Voor de kliniek heeft deze mededeling wel konsekwenties. Het geregeld bepalen van eiwit in de urine en van het bloedureum om de dag

zou een extra veiligheidsmarge kunnen bieden. Het vaak snel en ernstig reageren van oude mensen op methotrexate zou mogelijk verklaard kunnen worden door de invloed van MTX op nierweefsel meteen marginale functie ten gevolge van arteriosklerose.

De publikatie van NICHOL en WELCH (1950) geeft aanwijzingen tot een specifieke behandeling van de toxische verschijnselen. Het bleek, dat toxische reacties van aminopterine bij muizen en ratten voorkomen konden worden door „citrovorumfaktor”.

BURCHENAL en medewerkers (1951) deelden mee, dat ook bij muizen „citrovorumfaktor” op zijn minst 12 tot 24 keer aktiever is dan foliumzuur, wat betreft de remming van het antileukaemisch effect van aminopterine. Verder bleek (BURCHENAL en BABCOCK 1951) dat toediening van „citrovorumfaktor” 15 minuten vóór tot 1 uur ná toediening van zeer toxische doses methotrexate een duidelijke intoxicatie voorkwam. Van deze beschermende werking van „citrovorumfaktor” wordt nog steeds gebruik gemaakt bij o.a. intra-arteriële infusietherapie met methotrexate (o.a. SULLIVAN 1961; KLOPP 1961).

SCHOENBACH, GREENSPAN en COLSKY beschreven in 1950 twee patienten met een zeer ernstige intoxicatie ten gevolge van orale toediening van methotrexate. Na staken van het cytostaticum en toediening van „leukovorin” zagen zij een drastische verbetering optreden. Hierbij moet men wel bedenken dat de therapeutische werking van methotrexate teniet gedaan wordt.

De toediening van methotrexate eist een nauwkeurige begeleiding en een controlesysteem dat in een volgend hoofdstuk nader zal worden toegelicht.

1. Klinische resultaten van oraal of intraveneus toegediend methotrexate alleen.

De gunstige resultaten van aminopterine bij leukaemische patienten beschreven door FARBER en medewerkers (1948) deed het klinische gebruik van aminopterine en later van methotrexate met sprongen toenemen.

In 1949 publiceerden THIERSCH en PHILIPS een overzicht van de waarnemingen van oraal toegediende foliumzuurantagonisten, toegepast op velerlei kankervormen. Het bleek dat akute leukaemiepatienten in 30% der gevallen een gedeeltelijke remissie toonden. Andere vormen, zoals carcinomen, sarcomen, melanoblastomen, ziekte van Hodgkin etc., gaven slechts zelden enige verbetering te zien.

SCHOENBACH, COLSKY en GREENSPAN (1952) behandelden 31 volwassen patienten en 8 kinderen, lijdende aan diverse vormen van kanker, met aminopterine en methotrexate. De patienten kregen het middel per os toegediend. Een klinisch duidelijke verbetering, gepaard gaande met een remissie werd bij 5 van 8 kinderen, lijdende aan akute leukaemie, gezien. De meeste solide tumoren toonden geen teruggang. Slechts bij 9 patienten met een solide carcinoom ontstond een partiële tumorregressie. De dosering varieerde van 5 tot 25 mg methotrexate per dag of 1 tot 3 mg aminopterine per dag. Zeer ernstige toxische verschijnselen deden zich niet voor.

Eén van de eerste publikaties over het gebruik van oraal toegediend methotrexate bij de behandeling van carcinomen in het hoofd-halsgebied verscheen in 1962 (HUSEBY en DOWNING). Het doseringsschema bestond uit 25 mg methotrexate, verdeeld over de dag, gedurende 5 dagen tot een totaal van 125 mg. Dan volgde een interval van 1 maand, waarna wederom eenzelfde hoeveelheid methotrexate werd gegeven. Indien een regressie van de tumor werd waargenomen, werd een onderhoudsdosering gegeven van 5 tot $7\frac{1}{2}$ mg per dag. Afhankelijk van de ernst van de intoxicatie werd de dosering van methotrexate verlaagd. Er werden 8 patienten behandeld. Bij deze patienten was het carcinoom zo ver voortgeschreden, dat een andere vorm van therapie niet meer mogelijk was. Van deze 8 patienten reageerden er 3 goed:

2 patienten waren tumorvrij na respectievelijk 2½ en 13 maanden, 1 patient toonde na 7 maanden weer tumorgroei, maar was na 1 jaar nog in leven. Van de andere 5 patienten lieten er 2 een tumorregressie van $\pm 50\%$ zien, terwijl er 3 patienten niet reageerden. Nadat men op een onderhoudsdosering was overgegaan, ontstond zeer snel weer tumorgroei. Ook bij deze 8 patienten bleek de toxiciteit van het middel: 2 patienten kregen een zeer ernstige leukopenie, 4 patienten toonden een dermatitis, 2 patienten kregen een pneumonie, waaraan 1 patient stierf. Praktisch alle patienten ontwikkelden een min of meer ernstige stomatitis.

PAPAC en medewerkers (1963) publiceerden hun ervaringen van oraal en intraveneus toegediend methotrexate bij respectievelijk 24 en 23 patienten, lijdende aan plaveiselcelcarcinoom in het hoofd-halsgebied. De 24 patienten kregen 15 mg methotrexate per dag oraal toegediend gedurende 5 dagen, de 23 patienten kregen 25 mg methotrexate per dag gedurende 5 dagen via de intraveneuze route. In de eerstgenoemde groep van 24 patienten hadden 4 patienten een tumorregressie van 50% of meer, 5 patienten minder dan 50% en 15 patienten toonden geen regressie. De tweede groep (23 patienten) toonde ook bij 4 patienten tumorregressie van 50% of meer, bij 8 patienten minder dan 50% en de rest niet. De langste regressieperiode bedroeg 7 maanden, gemiddeld echter 1 maand, onafhankelijk van de toedieningswijze. Duidelijke intoxicatieverschijnselen (beenmergdepressie, stomatitis) werden bij 17 van de 24 patienten gezien, die met oraal toegediend methotrexate werden behandeld. Van deze 17 patienten stierven er 3. Bij de groep van 23 patienten behandeld met intraveneus toegediend methotrexate zag men slechts in 8 gevallen een duidelijke toxische reactie. Indien we de toxische reacties uit de eerste groep, behandeld met 15 mg methotrexate per os per dag, vergelijken met de tweede groep die 25 mg methotrexate intraveneus per dag ontving, dan valt zeer duidelijk op dat de eerste groep veel ernstiger toxische reacties toonde dan de tweede. Dit is zeer goed verklaarbaar daar de fraktionering over de dag van grotere invloed is dan de totale dagdosis.

In 1967 publiceerden PAPAC, LEFKOWITZ en BERTINO hun resultaten bij 15 patienten met tumoren in het hoofd-halsgebied. De patienten hadden reeds allen radiotherapie ondergaan, terwijl chirurgische therapie onmogelijk was. Methotrexate werd om de 4 dagen intraveneus gegeven in een dosering van 0,8 mg/kg lichaamsgewicht in één keer, totdat zich tekenen van toxiciteit voordeden. Het bleek dat 8 van de 15 patienten tumorregressie van meer dan 50% toonden. De regressieduur varieerde van 2 weken tot 4 maanden met een gemiddelde duur van 2 maanden. Alle patienten met tumorregressie toonden subjectieve verbeteringen: vermindering van pijn, gewichtstoename, malaisevermindering etc. Wat de toxische reacties betrof, slechts één van de 15 patienten kreeg een ernstige stomatitis. Alle patienten op één na kregen

leukopenie en thrombopenie. Er waren geen petechiën en evenmin was er diarree. De auteurs wezen erop dat deze vorm van toediening en dosering blijkbaar minder toxisch was dan andere (frekwentere) toedieningsvormen.

Een interessante bijdrage leverden SULLIVAN, MILLER, ZUREK, OBERFIELD en OJIMA (1967). Zij behandelden 161 patienten lijdende aan zeer verschillende vormen van maligne tumorgroei met methotrexate. De toedieningswijze was $4 \times 1,25$ mg per os per dag of 5 mg intraveneus per 24 uur. De behandeling werd voortgezet, totdat zich toxische reacties gingen voordoen. Dan werd de therapie gestaakt. Alvorens weer met een nieuwe toediening te beginnen werd gewacht tot de toxische verschijnselen geheel teruggedaan waren. Van de in totaal 161 behandelde patienten werd er bij 52 ($\pm 30\%$) een tumorregressie van meer dan 50% gezien, langer durende dan 2 maanden. Opmerkelijk was dat bij 13 patienten met tumoren in het hoofd-halsgebied er 7 goed reageerden, hetgeen een duidelijk beter resultaat lijkt dan het gemiddelde. De duur der remissies varieerde van 2 tot 15 maanden met een gemiddelde van 4,4 maanden. Het eerste verschijnsel van intoxicatie bleek ook bij deze patienten een daling van het aantal leukocyten in het perifere bloed te zijn. In afnemende mate deden zich symptomen voor van stomatitis, misselijkheid, haaruitval, huidverschijnselen en enterocolitis.

LEONE en medewerkers (1968) behandelden 35 patienten met carcinoom in het hoofd-halsgebied met methotrexate. De dosering bedroeg een wekelijks toegediende intraveneuze injectie van 60 mg/m² lichaamsoppervlak. Indien zich toxische verschijnselen voordeden werd de therapie gestaakt, totdat de verschijnselen geheel teruggedaan waren. Patienten die een duidelijke tumorregressie toonden, kregen een onderhoudsdosis van methotrexate. Deze dosis bestond uit 60 mg/m² lichaamsoppervlak om de 2 tot 4 weken intraveneus toegediend. Zij zagen bij 11 patienten een complete tumorregressie optreden (31%), terwijl 9 patienten een partiële tumorregressie toonden (26%). De gemiddelde duur van complete tumorregressie bleek 5,3 maanden te zijn, terwijl partiële tumorregressie gemiddeld 3,9 maanden duurde. Ernstige toxische reacties van methotrexate deden zich ook hier voor: 3 van de 35 patienten overleden.

Nevenstaande publikaties tonen aan, dat oraal c.q. intraveneus toegediend methotrexate als behandeling van patienten met maligne tumoren teleurstellend is. Tumorregressie, langer dan 7 maanden, is een uitzondering, en bovendien is het middel nog zeer toxisch. Hierbij valt op dat toxische verschijnselen van peroraal toegediend methotrexate ernstiger zijn dan intraveneuze toediening, hoewel de kuren niet geheel vergelijkbaar zijn en het aantal patienten klein is. Een korrelatie tussen de ernst van de toxische verschijnselen en de reactie van de tumor lijkt niet te bestaan.

In het kort kunnen deze publikaties als volgt worden samengevat:

auteur	aantal pat.	dosering	tumor- plaats	regressie- graad	gem.rem. duur	toxiciteit
SCHOENBACH 1952 e.a.	31	25 mg oraal per dag	diverse	9/31 partieel	niet vermeld	niet ernstig
HUSEBY 1962 e.a.	8	25 mg oraal per dag ged. 5 dagen	hoofd- hals	3/8 > 50% 2/8 50% 3/8 niet	7 mnd 2 mnd	2/8 ernstig
PAPAC 1963 e.a.	24	15 mg oraal per dag ged. 5 dagen		4/24 > 50% 5/24 < 50%		17/24 ernstig 2 overleden
			hoofd- hals		1 mnd	
	23	25 mg i.v. per dag ged. 5 dagen		4/23 > 50%		8/23 ernstig
PAPAC 1967 e.a.	15	± 60 mg i.v. om de 4 dagen	hoofd- hals	8/15 > 50%	2 mnd	1/15 ernstig
SULLIVAN 1967 e.a.	161	4 × 1,25 mg oraal of 5 mg i.v. per dag	diverse	52/161 > 50% (7/13 > 50% hoofd-hals)	4,4 mnd	niet ernstig
LEONE 1968 e.a.	35	± 120 mg i.v. per week	hoofd- hals	11/35 100% 9/35 partieel	5,3 mnd 3,9 mnd	3/35 overleden

2. Experimenteel onderzoek betreffende combinatie van methotrexate met radiotherapie.

Hoewel de kliniek voorging in de combinatie van cytostatica en radiotherapie, is het voor overzicht en begrip van belang, dat eerst het voornaamste van het experimentele werk op dit gebied wordt genoemd.

Het effect van bestraling is afhankelijk van milieufactoren. Eén van de eerste mededelingen op dit gebied was die van SCHWARZ (1909). Hij vermeldde, dat de ernst van huidreacties na röntgenbestraling afneemt indien de huid ischaemisch c.q. anoxisch werd. HOLTHUSEN (1921) meldde, dat de stralengevoeligheid van een cel in aëroob milieu drie keer zo groot is als onder anaërobe kondities. Hieruit bleek al de enorme invloed van de zuurstofspanning als milieufactor bij bestraling. Een stof, die het klinisch effect van bestraling vergroot, kan dit op grond van de volgende mogelijkheden doen:

a. de stof heeft een additief c.q. potentiërend effect op röntgenbestraling van een tumor.

b. de stof heeft een beschermende werking op het gezonde weefsel, waardoor het mogelijk is de tumor een hogere dosis te geven.

De onder *a* genoemde begrippen verdienen nadere uitleg. Men spreekt in dit geval van additie indien het uiteindelijke effect de som is van de effecten van de stof en van de bestraling. Bij potentiëring is het uiteindelijke effect groter dan de som van beide, waarbij het denkbaar is, dat de stof alléén het waargenomen effect niet veroorzaakt.

Toen bleek, dat een eenvoudige stof als zuurstof een potentiërend effect op de werking van stralen kan hebben, was het niet verwonderlijk, dat in het laboratorium ook vele andere stoffen met röntgenstralen werden gekombineerd, teneinde een sterker effect op tumorweefsel te verkrijgen. In een overzichtsartikel van GRAY in 1960 worden deze chemicaliën opgesomd: Vit. K, inerte gassen, zwavelwaterstof, p-chloromercuribenzoaat, alcohol, glycol, glycerine etc. Hij kwam tot de konklusie, dat voor klinisch gebruik alleen de combinatie van zuurstof met röntgenstralen bruikbaar was. De auteur maakte geen melding van de groep der cytostatica, hoewel reeds het stikstofmosterdgas in combinatie met radiotherapie in 1951 door ROSWIT en KAPLAN bij de behandeling van bronchuscarcinoom werd gebruikt. Het valt op dat ook in het laboratorium tot \pm 1960 nauwelijks experimenten betreffende de combinatie van cytostatica met röntgenstralen plaatsvonden. Hun combinatie ligt voor de hand. Beide hebben ze een duidelijk reducerend vermogen op tumorweefsel. Hierbij kwam nog dat klinische toepassing reeds op ruime schaal geschiedde (HODNETT 1963).

Het is dan ook de grote verdienste van BERRY, dat hij zich in het begin van de zestiger jaren uitgebreid met de combinatie van verschillende cytostatica en röntgenbestraling heeft beziggehouden. In 1965 verscheen een samenvattend artikel van zijn hand, waarin hij verslag doet over het effect van de combinatie van cytostatica en röntgenstralen op weefselkultures van maligne cellen. Bij zijn experimenten was een duidelijke potentiëring van deze stoffen op röntgenstralen gebleken. Als belangrijkste van deze cytostatica worden in het artikel genoemd:

a. *Actinomycine-D*. Dit antibioticum beïnvloedt de RNA-synthese. BASES toonde in 1959 bij proeven op menselijke cellen in vitro aan dat bij deze stof een duidelijk potentiërend effect bij éénmalige röntgenbestraling optreedt. Tevens werd gevonden dat het celherstel tussen gefractioneerd toegediende röntgenbestralingen dan langzamer verliep. Ondanks toxische verschijnselen zijn goede resultaten met de combinatie in de literatuur vermeld (HODNETT 1963).

b. *Puromycine*. Dit antibioticum beïnvloedt de proteïnesynthese. Ook deze stof potentieert in hoge dosering het effect van één enkele röntgendosis. In tegenstelling tot actinomycine-D wordt het herstel van de cellen tussen gefractioneerde bestralingen niet beïnvloed. Klinisch

wordt deze stof in combinatie met radiotherapie praktisch niet toegepast.

c. *5-Fluorouracil en 5-Fluorodeoxyuridine*. (5-FU en 5-FUdR). Het 5-FU beïnvloedt de DNA-synthese. Potentiëring van röntgenbestraling treedt al op bij relatief geringe concentraties van het middel (BAGSHAW 1961). De herstelfase van de cellen tussen gefractioneerde bestralingen in wordt, zelfs in hoge concentraties, niet beïnvloed (BERRY, 1965, 1966). In combinatie met radiotherapie wordt het 5-FU veelvuldig toegepast, echter met wisselend sukses (overzicht HODNETT, 1963, ANSFIELD, 1971). Het 5-FUdR is niet in combinatie met bestraling, doch met halopyrimidines gebruikt (zie d.).

d. *Chloor-, broom-, en jooddeoxyuridine* (resp. CIUdR, DUdR en IUdR). Deze stoffen kunnen in het DNA-molekuul worden geïncorporeerd, waardoor een defekt DNA-molekuul ontstaat (SZYBALSKI, 1960). Het effect van röntgenbestraling (DELIHAS, RICH en EIDNOFF, 1962; BERRY en ANDREWS, 1962), wordt gepotentiëerd als één procent van de totale hoeveelheid DNA-molekullen halogeen bevatten. Klinisch kan van deze stoffen alleen resultaat verwacht worden als de tumorcellen actiever DNA vormen dan normale cellen c.q. meer halogeen binden. Dat deze stoffen klinisch niet voldoen, komt door het feit dat de lever oorzaak is van een snelle dehalogenatie. Hierdoor wordt het zeer moeilijk een konstant hoge serumconcentratie te handhaven (KRISSE en REVESZ, 1962).

In dit artikel wordt ook het methotrexate genoemd als een stof met een potentiërend vermogen. In verband met de goede eigenschappen volgde een artikel in 1967, dat speciaal aan methotrexate gewijd was. BERRY beschreef hierin de werking van methotrexate en röntgenstralen op menselijke tumorcellen in vitro. Hij gebruikte voor al zijn experimenten kulturen van HeLa S₃₀x^r-cellen, afgeleid van een menselijk cervixcarcinoom. Hierbij werden enkele zeer interessante waarnemingen gedaan:

a. *Het effect van alleen MTX op de cel.*

Het bleek, dat de celdeling geen invloed ondervond, indien de cellen 24 uur werden blootgesteld aan een MTX-concentratie van $< 30 \mu\text{g/ml}$. Boven deze concentratie nam het celdelend vermogen af. Bij een concentratie van $\pm 300 \mu\text{g/ml}$ per 24 uur overleefde $\pm 10\%$ van het oorspronkelijk aantal tumorcellen. Merkwaardig is dat hogere concentraties dan $300 \mu\text{g/ml}$ per 24 uur niet in een toeneming van celsterfte resulteerden. Deze waarneming wordt grafisch in figuur 8 weergegeven. Het snel recidiveren van tumoren na MTX-behandeling, zoals dit in hoofdstuk III wordt beschreven, kan wellicht hieruit verklaard worden.

Verder bleek, dat er verschil in celoverleving bestond tussen cellen, waarbij methotrexate op het moment van celenting (in de z.g. „lag” –

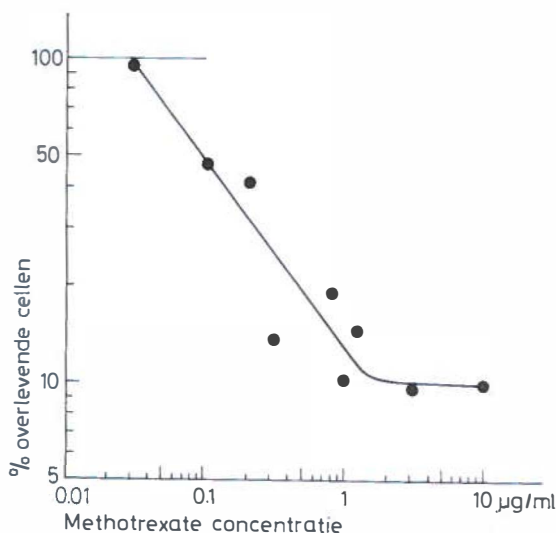


Fig. 8. Overlevingspercentage van HeLa S_{30xf}-cellen, indien blootgesteld aan verschillende concentraties methotrexate (BERRY 1968).

fase) aan de voedingsbodem werd toegevoegd en cellen, waarbij methotrexate 18 uur na de celenting (in de z.g. „log” – fase) werd toegevoegd. Alleen de cellen, die zich in de „log” – fase bevonden en in contact waren met methotrexate, toonden een duidelijk verminderde cel-overleving. De verklaring ligt in het feit, dat de cellen in de „lag” – fase nog geen DNA vormen in tegenstelling tot de cellen in de „log” – fase.

b. *Het effect van röntgenstralen op met MTX behandelde cellen*

Zoals reeds gezegd werd, bleken MTX-koncentraties lager dan 30 µg/ml per 24 uur geen invloed op het celdelend vermogen te hebben. Wanneer 24 uur lang aan de voedingsbodem een op zichzelf onwerkzame concentratie methotrexate (≤ 30 µg/ml) werd toegevoegd, dan leverde een bepaalde bestraling echter een groter effect op dan zonder MTX-toevoeging. Dit is een typisch geval van potentiëring.

Het effect van röntgenbestraling is sterk afhankelijk van de zuurstofconcentratie in het milieu. De „oxygen enhancement ratio” (d.i. de verhouding tussen de hoeveelheid rads, die nodig is om een bepaalde celsterfte te krijgen in anaëroob dan wel aëroob milieu) veranderde niet bij deze lage concentratie methotrexate. Wanneer echter de cellen 24 uur lang behandeld werden met methotrexate in een hogere concentratie van 300 µg/ml bleek, buiten de potentiëring van het bestralings-effect, ook nog een verminderde „oxygen enhancement ratio” (bij 10% celoverleving van 2,6 naar 1,8): dit wil zeggen dat het effect van anoxie minder verschil maakt. Deze belangrijke

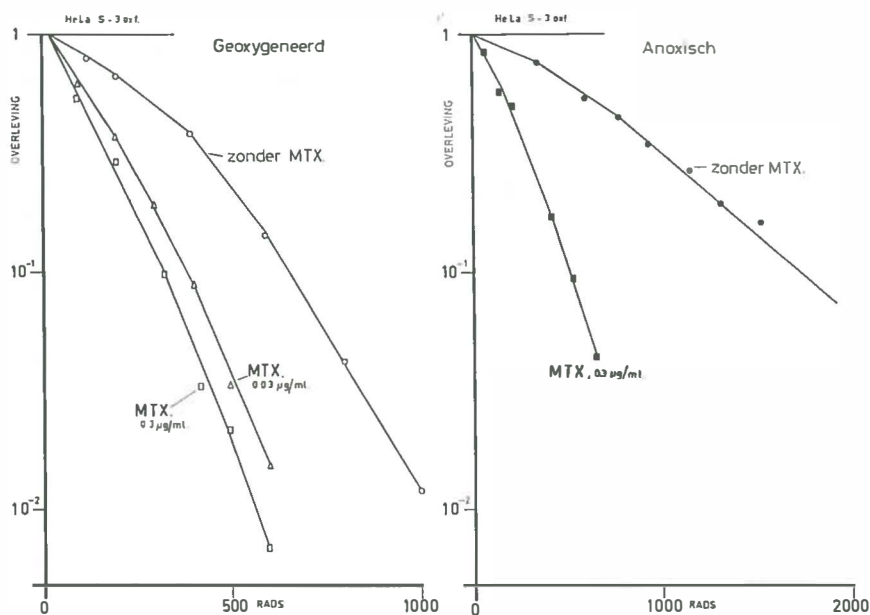


Fig. 9. Potentiëring van het bestralingseffect in vitro door methotrexate, onder aërobe en anaërobe omstandigheden (BERRY 1968).

waarneming is in figuur 9 weergegeven. Uit verdere proefnemingen kwam nog naar voren dat er, bij bestraling 24 uur na het verwijderen van methotrexate uit de voedingsbodem, geen verschil meer bestond met het gedrag van niet met methotrexate behandelde cellen.

c. Het effect van methotrexate op het celherstel tussen gefractioneerd toegediende röntgendoses

Na bestraling met 300 rads treedt bij concentraties ≤ 30 $\mu\text{g/ml}$ een duidelijk celherstel in, zelfs indien het effect van de bestraling versterkt was, doordat 18 uur van tevoren MTX aan de voedingsbodem werd toegevoegd. Een duidelijk onvermogen tot celherstel na bestraling trad op bij een concentratie van 300 $\mu\text{g/ml}$, waarbij het methotrexate 16 tot 19 uur voor de eerste bestraling aan de voedingsbodem werd toegevoegd. Werd het methotrexate 24 uur vóór de eerste bestraling verwijderd, dan werd, evenals bij éénmalige bestraling, praktisch geen verschil gezien met niet met methotrexate behandelde HeLa-cellen.

BERRY kwam, gezien bovenstaande experimentele waarnemingen tot enige suggesties betreffende de klinische toepassing van de combinatie-therapie:

1. Het is van weinig betekenis methotrexate toe te dienen in de vorm van één enkelvoudige hoge dosis. Het methotrexate blijft slechts korte tijd in de cirkulatie en heeft alleen effect op de cellen die op dat moment DNA vormen. Het is effectiever om vele kleinere doses te geven.
2. Het geven van een kuur met methotrexate voorafgaande aan de bestraling zal weinig verschil maken met het geven van bestraling alleen. Een etmaal na het verwijderen van het methotrexate uit de voedingsbodem bleken de HeLa-cellen wat betreft hun gevoeligheid voor röntgenstralen geen verschil meer te tonen met niet voorbehandelde cellen.
3. Gezien het gunstige bestralingseffect op anoxische met methotrexate voorbehandelde HeLa-cellen moet een zo hoog mogelijke methotrexate-dosering gegeven worden en wel op zijn laatst gedurende 24 uur voor het tijdstip van bestraling.
4. Omdat door MTX het celherstel tussen de bestraling belemmerd wordt, kan een onverwacht sterk effect op gezond weefsel verwacht worden. Dit effect van MTX was CONDIT c.s. (1964) bij klinische toepassing reeds opgevallen.
5. De optimale manier om methotrexate met radiotherapie te combineren is zijns inziens de volgende: het totaal aantal frakties moet zo klein mogelijk gehouden worden. Elke bestraling dient te worden voorafgegaan door een korte kuur (24-48 uur) met methotrexate in een optimale dosering. Het methotrexate kan oraal toegediend worden en wel om de 6 uur. Na de bestraling wordt geen methotrexate meer toegediend tot 24-48 uur vóór de volgende bestraling. De bestralingen vinden éénmaal per week gedurende 6 achtereenvolgende weken plaats.

Op deze suggesties, gedaan vanuit het laboratorium, is zeker kritiek te leveren. Klinisch heeft men te maken met cellen in tumorverband, waarvoor andere milieufactoren gelden. Hierop zal in hoofdstuk IV-2 nader ingegaan worden. Wel kunnen we konkluderen, dat aan de hand van de figuren 6 en 7 bij een serumconcentratie methotrexate van $\pm 200 \mu\text{g/ml}$ een weefselconcentratie van 50-100 μg per gram weefsel hoort. Deze concentratie wordt zeker met de door ons toegepaste dosering van 3 dd. 2,5 mg per os bereikt. Er wordt dan zowel van de potentiëring (al optredend bij een concentratie van $\leq 30 \mu\text{g}$ per ml) als van de verminderde „oxygen enhancement ratio” (al optredend bij een concentratie van 30 μg per ml) gebruik gemaakt. De bevindingen in het laboratorium vormen een aanwijzing, dat hogere concentraties MTX meer effect opleveren. Derhalve is het van belang bij klinische toepassing optimaal te doseren. Het heeft echter geen zin om te trachten extreem hoge serumconcentraties te bereiken (BERRY, fig. 8).

De orale toediening van methotrexate gekombineerd met radiotherapie bij kanker in het hoofd-halsgebied

Hoofdstuk IV

1. *Gegevens verzameld uit de literatuur.*

Mededelingen over het gebruik van oraal toegediend MTX gekombineerd met radiotherapie als behandeling van tumoren in het hoofd-halsgebied, zijn gering. Meestal zijn slechts kleine aantallen patiënten op verschillende manieren behandeld, zowel wat betreft de wijze van toediening (oraal, intraveneus, intra-arterieel, infusie) als het tijdstip van toediening ten opzichte van de bestraling (voorafgaand aan of tegelijkertijd met de bestraling). Het is dus moeilijk om de resultaten uit de literatuur naar waarde te schatten en te vergelijken met andere methoden van behandeling en met eigen resultaten. Ondanks dit bezwaar is het van waarde de literatuurgegevens te verzamelen om althans een indruk te krijgen van de voor- en nadelen van de gekombineerde therapie.

Eén van de eerste publikaties op dit gebied verscheen van de hand van FRIEDMAN en DALY (1963). Zij deelden mee, dat zowel oraal als regionaal geïnfundeerd MTX zeer werkzaam is bij de behandeling van plaveiselcelcarcinomen in het hoofd-halsgebied. Om aan te tonen dat MTX en radiotherapie betere resultaten gaven dan één van beide afzonderlijk, stelden zij, dat MTX plus een subletale dosis röntgenstralen een letaal effect op de tumor moest sorteren. (De term „subletale dosis” is een moeilijk te omschrijven begrip. Praktisch komt het neer op een dosering van 3400 rad in 18 dagen tot 4860 rad in 41 dagen).

In een eerste poging zijn 47 patiënten op verschillende manieren met MTX in combinatie met radiotherapie behandeld. Bij 40 patiënten werd MTX oraal toegediend in een dosering van 5 tot $7\frac{1}{2}$ mg per dag, terwijl de overige 7 patiënten regionaal werden geïnfundeerd. Het criterium voor een goed resultaat was complete regressie van de tumor over een periode van tenminste 7 maanden. De patiënten werden in vier behandelingsgroepen ingedeeld, te weten:

Groep A

Deze groep patiënten kreeg MTX-behandeling totdat een duidelijke tumorreactie optrad. Dan werd de toediening van MTX gestaakt en een letale of subletale dosis röntgenstralen gegeven.

Groep B

Deze groep patiënten kreeg MTX-behandeling en zodra de tumor in grootte afnam, werd radiotherapie gegeven onder continuering van MTX gedurende de hele bestraling. Ook hier werd een subletale of letale dosis röntgenstralen gegeven.

Groep C

Bij deze groep patiënten waren multipale lymfkliermetastasen aanwezig. Eén gedeelte van deze lymfklieren ontving alleen bestraling, een ander gedeelte, in een andere behandelperiode, MTX en bestraling.

Groep D

Deze groep patiënten ontving van de eerste dag der behandeling af MTX en bestraling tegelijkertijd.

Hierbij konden enige interessante waarnemingen gedaan worden. Van de 42 tumoren die met oraal toegediend MTX behandeld werden, toonden 19 tumoren (= 45%) een significante verkleining, voordat radiotherapie werd gegeven.

Ook FRIEDMAN en DALY konkludeerden toen reeds op grond van hun klinische waarnemingen dat er kleine groepen cellen bestonden, die ondanks het MTX toch doorgroeiden. Deze cellen ontsnapten blijkbaar aan de werking van het cytostaticum. Een overeenkomstige waarneming deed BERRY (1967) bij zijn experimenteel werk met HeLaS_{30xt}-cellen.

Een potentiërende werking van oraal toegediend MTX op het bestralingseffekt bleek, doordat van de 13 tumoren uit de groepen A en B behandeld met MTX en een subletale bestralingsdosis, 7 tumoren geheel verdwenen voor een periode van minstens 7 maanden. De auteurs vonden dit resultaat beter dan met bestraling alleen verwacht mocht worden. Helaas werd door de schrijvers niet op de resultaten van iedere groep afzonderlijk ingegaan; wel werd van iedere groep een voorbeeld beschreven. De meest interessante en suggestieve ziektegeschiedenis wordt hierna kort vermeld, omdat deze als eerste klinische waarneming het potentiërend effect van MTX op bestraling suggereert. Het betrof een patient die behoorde tot de groep patiënten vermeld onder groep C (één groep lymfkliermetastasen werd met MTX en radiotherapie behandeld, de andere groep lymfkliermetastasen kreeg alleen radiotherapie). Patient leed aan een ongedifferentieerd carcinoom van de nasopharynx met multipale halskliermetastasen. Besloten werd de primaire tumor en de bovenste halskliermetastasen tegelijkertijd met MTX en radiotherapie te behandelen. De MTX-dosering bedroeg 125 mg MTX oraal in 37 dagen. De tumordosis bedroeg 6600 rad in 39 dagen. Acht dagen later werden de onderste halskliermetastasen

bestraald. De tumordosis bedroeg 6700 rad in 39 dagen. Het resultaat van de behandeling was, dat de primaire tumor en de bovenste halskliermetastasen volledig verdwenen waren, terwijl de onderste halskliermetastasen niet geheel verdwenen waren en binnen een jaar weer groter werden.

CONDIT en medewerkers (1964) beschreven een met MTX en bestraling behandelde groep van 25 patienten (28 tumoren) met inoperabele tumoren in het hoofd-halsgebied. Zij volgden drie behandelings-schema's:

Schema I

Dagelijkse bestralingsdosis van 200 rad per fraktie, 5 keer per week gedurende 5 weken tot een totale tumordosis van 5000 rad. MTX werd intraveneus toegediend in een dosering ineens van 1,3 tot 23 mg/kg lichaamsgewicht. Deze injecties werden ongeveer om de twee weken gegeven gedurende de bestralingsperiode.

Schema II

Tweemaal per week een bestraling van 500 rad per fraktie, gedurende 5 weken tot een totale tumordosis van 5000 rad. De MTX toediening geschiedde als bij schema I.

Schema III

Bestralingen op drie achtereenvolgende dagen met 400 tot 800 rad per fraktie. Twee weken later volgde wederom eenzelfde behandeling. Bij iedere bestraling werd MTX intraveneus gegeven in de reeds genoemde dosering.

Van de 11 patienten vallend onder schema I toonden 6 een komplette en 4 een partiële tumorregressie. Gemiddeld bleef de tumorremissie $7\frac{1}{2}$ maand bestaan. De 7 patienten vallend onder schema II, lieten geen duidelijk ander beeld zien: 3 patienten hadden een komplette en 3 patienten een partiële tumorregressie. Eén patient overleed ten gevolge van MTX-intoxicatie. De gemiddelde tumorremissieduur bleek $6\frac{1}{3}$ maand te zijn. De 7 patienten, behandeld volgens schema III toonden wel een enigszins ander beeld: 4 patienten hadden een komplette en 3 patienten een partiële tumorregressie. De gemiddelde duur van de remissie bleek echter $15\frac{1}{2}$ maand te zijn. Ook de toxiciteit van MTX in de laatste groep was duidelijk minder dan die in beide voorafgaande groepen.

In een artikel beschreven CONDIT, LEVITT en medewerkers (1966) een groep van 30 patienten met inoperabele tumoren in het hoofd-halsgebied, waarvan de helft van de patienten met intraveneus MTX en radiotherapie, en de andere helft met overeenkomstige radiotherapie werden behandeld. Bij controle na twee jaar zagen zij tussen

de groepen geen verschil in tumorremissieduur (resp. 4,8 en 4,2 maanden).

KLIGERMAN en medewerkers (1966) behandelden 22 patiënten, lijdende aan uitgebreide tumoren in het hoofd-halsgebied, voor de helft van het aantal patiënten met radiotherapie alleen en voor de andere helft met MTX en radiotherapie. Hun schema van toediening was als volgt: intraveneuze toediening van MTX in een dosering van 0,2 mg/kg lichaamsgewicht per dag gedurende vijf dagen. Op de 15e dag na het begin van de intraveneuze MTX-toediening werd radiotherapie gegeven in een gemiddelde dosering van 6300 R in 45 dagen. De patiënten die alleen radiotherapie ontvingen, kregen gemiddeld 6000 R in 45 dagen. Op het tijdstip van controle bleken de patiënten, bij wie MTX en bestraling werden gegeven een gemiddelde overleving van 7 maanden te hebben. De patiënten die alléén radiotherapie hadden ontvangen, overleefden 5½ maand. Hun motivering van deze wijze van combinatie van MTX met bestraling lag in het feit, dat na 15 dagen de optredende mucositis weer genezen zou zijn, terwijl de tumorregressie het maximum bereikt zou hebben. Ook bleek uit de nakontrolé dat de met MTX voorbehandelde patiënten, die een tumorregressie van 25% of meer toonden, een duidelijk beter bestralingsresultaat hadden (4 van de 5 patiënten na 3-11 maanden tumorvrij) dan de patiënten die geen tumorregressie op de MTX-kuur toonden (één van de 6 patiënten na 8 maanden tumorvrij).

Op het 2e symposium over het gebruik van MTX in de behandeling van kanker (gehouden in 1964, gepubliceerd in 1966) deelde PHILIP zijn ervaringen mee over het direkte resultaat van diverse combinaties van MTX en bestraling bij uitgebreide tumoren in het hoofd-halsgebied. Een samenvatting van de resultaten wordt als volgt weergegeven:

	methode	aantal patiënten	aantal komplete tumor- remissies	aantal inkomplete tumor- remissies	geen tumor- remissie
I	alleen radiotherapie	32	11	9	12
II	alleen chemotherapie als eerste behandeling	6	4 (3 overl.)	1	1
III	chemotherapie + bestraling als eerste therapie	13	7	2	4
IV	chemotherapie voor tumorrecidief	9	1	2	6
V	chemotherapie + bestraling voor tumorrecidief	6	1	4	1

De auteur sprak van een komplette tumorregressie, wanneer de tumor in het behandelde gebied klinisch geheel was verdwenen. De waarde van deze publikatie is van des te meer betekenis, doordat vergelijking mogelijk is met een groep van 32 patienten die alleen met bestraling werd behandeld. De patienten vallend onder methode III kregen MTX op velerlei verschillende manieren toegediend (intra-arteriële perfusie, intraveneus en peroraal).

Hoewel de direkte resultaten van methode III mogelijk wat beter lijken, mogen hieraan geen konklusies worden verbonden, daar de groepen klein en niet geheel vergelijkbaar zijn. Opnieuw blijkt hoe moeizaam het is om een onderzoek op dit gebied te doen.

Eén van de eerste, goed gefundeerde na-onderzoeken over de combinatie van MTX en radiotherapie bij zeer vergevorderde stadia van kanker in het hoofd-halsgebied, werd in 1967 door SOUTHARD, KRAMER en MANSFIELD gepubliceerd. Er waren 57 patienten behandeld. Praktisch alle patienten behoorden, bij indeling volgens het TNM-systeem voor tumoren, tot de T3 en T4-tumoren. De primaire tumoren gingen uit van sinus paranasales en nasopharynx (7 pat.), mondholte (7 pat.), oropharynx (33 pat.) en laryngopharynx (10 pat.). Deze patienten kregen gedurende één week 3 dd. $2\frac{1}{2}$ mg MTX per os, afnemend op geleide van de toxische reacties. Aan het eind van deze week werd met radiotherapie begonnen tot een totale dosis van gemiddeld 6500 rad in 6 tot 7 weken. MTX werd zo lang mogelijk tegelijk met radiotherapie gegeven. Meer dan 50% van de zo behandelde patienten kreeg een ernstige stomatitis en bij gemiddeld 40% ontwikkelden zich symptomen van beenmergdepressie. De auteurs konden van de 57 patienten de overleving na $1\frac{1}{2}$ jaar nagaan. Tevens kon van 35 patienten de 3-jaars overleving worden onderzocht. Van deze 57 patienten overleefden 18 patienten een periode van minstens $1\frac{1}{2}$ jaar zonder zichtbare tumor in het behandelde gebied. Dit komt neer op een overlevingspercentage („survival rate”) na minstens $1\frac{1}{2}$ jaar van 32. In een observatieperiode van tenminste $1\frac{1}{2}$ jaar na het begin der therapie bleken 25 patienten (= 44%) vrij van lokaal recidief te blijven („local clearance rate”). Indien alleen de primaire tumoren beoordeeld werden bedroegen de cijfers resp. 35% en 49%. Vergelijking van de resultaten na 3 jaar liet zien, dat tumorrecidief na $1\frac{1}{2}$ jaar zeer ongewoon is. Van de 35 patienten die voor dit onderzoek beschikbaar waren, bleek de overleving na 3 jaar 25% (9 van 35 patienten) te zijn. Indien de patienten, die stierven door andere oorzaken dan de tumor of aan metastasen zonder aandoening van lokaal recidief (in totaal 10 patienten) buiten beschouwing gelaten werden, dan bleek het overlevingspercentage 36 te bedragen („primary clearance rate”). De auteurs schreven over hun resultaten als volgt: „*These survival figures in a group of patients, many of whom are chronic alcoholics and derelicts, and all of whom have massively advanced regional*

carcinoma, are far superior to those obtained by radiation therapy in the past".

In verband met het hoge toxiciteitspercentage van het driemaal daags oraal toedienen van MTX in deze dosering gingen de auteurs over op een intermitterend schema van MTX toediening, wat bestond uit perorale of intraveneuze doses van 25 mg MTX, die om de twee dagen werden gegeven. Hiermede werd een goede tumorregressie verkregen, terwijl de toxische verschijnselen duidelijk minder ernstig waren. KRAMER bracht in 1969 op het vierde jaarlijkse kankersymposium te San Francisco verder verslag uit over zijn ervaringen met de combinatie van MTX en radiotherapie (Telecobalt). Allereerst kwam hij op de reeds genoemde 57 patiënten terug, van wie nu de resultaten na 3 jaar bekend waren geworden. Het bleek dat 18 van de 57 patiënten na 3 jaar nog in leven waren. Dit is een overlevingspercentage van 32. Van 57 patiënten bleken er 35 vrij te zijn van lokaal recidief, d.i. 61%. Verder ging de auteur nu dieper in op de vorm van combinatietherapie waarbij MTX-vrije dagen werden ingevoerd, zoals reeds eerder werd vermeld (SOUTHARD, KRAMER, MANSFIELD, 1967). Deze „mini-split-course chemotherapy" werd op drie manieren beproefd:

- I. 25 mg MTX werd om de twee dagen één keer per os gegeven totdat toxische verschijnselen optraden. Op de vijfde tot de achtste dag na het begin van de MTX-therapie werd tevens met radiotherapie begonnen.
- II. Idem als I met als enig verschil dat MTX intraveneus werd toegediend.
- III. 25 mg MTX werd om de twee dagen één keer intraveneus toegediend tot een totaal van vijf injecties (125 mg). Op de dag na de vijfde injectie werd met radiotherapie begonnen.

De directe resultaten van deze therapie konden met de therapie die vroeger gevolgd werd, vergeleken worden. De toxiciteit bij de patiënten uit groep III bleek duidelijk minder te zijn dan die in de andere groepen zoals weergegeven wordt in onderstaande samenvatting, waarbij groep A bestaat uit patiënten die 3dd. $2\frac{1}{2}$ mg MTX kregen, gevolgd door radiotherapie op de 5e-8e dag.

	Groep A 57 pat.	Groep I 13 pat.	Groep II 16 pat.	Groep III 12 pat.
stomatitis ernstig	25	6	5	1
mild	11	4	3	1
beenmergdepressie ernstig	23	2	1	1
mild	10	—	3	1
andere (gastrointestinaal, etc.)	6	—	3	1

De direkte resultaten op de tumor worden in onderstaande tabel weergegeven:

	Groep A 57 pat.	Groep I + II + III 41 pat.
tumorregressie (tot maximaal 50% binnen 60-70 dagen)	55 (97%)	39 (95%)
tumorregressie minder dan 50%	2 (3%)	2 (5%)
komplete tumorregressie	32 (56%)	28 (68%)
inkomplete tumorregressie	25 (44%)	13 (32%)

Hoewel de patientenaantallen klein zijn, lijkt het er op, dat bij intermitterende MTX toediening het direkte effect op de tumor niet verschilt van dat bij de continue MTX toediening. De toxiciteit, vooral bij de intraveneuze toedieningswijze, is duidelijk afgenomen.

Tijdens hetzelfde symposium deelde FRIEDMAN zijn resultaten mee van patienten met carcinomen in het hoofd-halsgebied, die MTX en radiotherapie hadden ontvangen. Het principe van de gevolgde procedure was het apart toedienen van MTX als kuur vóór de radiotherapie. Deze kuur bestond uit 3 dd. $2\frac{1}{2}$ mg MTX per os gedurende 7-14 dagen of 25 mg MTX intraveneus om de twee dagen tot in totaal 5 maal. Daarna werd een volledige dosis radiotherapie gegeven. Op deze manier werden 104 patienten (106 tumoren) behandeld. Deze tumoren waren als volgt gelokaliseerd: mondholte en oropharynx (51), laryngopharynx (38), nasopharynx en sinus paranasales (17). In 62% der gevallen werd, na MTX-toediening alleen, een tumorregressie van meer dan 50% verkregen. De tumoren werden door de auteur in vier stadia onderverdeeld, waarbij tot stadium I tumoren werden gerekend, die lokaal infiltratie gaven, b.v. een necrotiserende, infiltrerende tumor van een gehemelteboog. Tot stadium IV behoorden tumoren, waarbij uitgebreide bilaterale of grote, met de omgeving vergroeide lymfkliermetastasen bestonden. De 2-jaarsresultaten worden hieronder als volgt weergegeven:

Stadium	aantal patienten	aantal patienten in leven	percentage 2 jaars- overlevenden	percentage lokaal tumorvrije patienten na 2 jaar
I	12	7	58	83
II	25	13	52	64
III	29	8	28	61
IV	38	9	24	42
Totaal	104	37	35	56

Het kommentaar dat auteur op bovenstaande resultaten gaf, luidde als volgt: „... *the results in this stage II group are impressive*”. Over de patienten uit groep III: „*In my own experience, this is a greater result than was previously attained with irradiation alone*”. Schrijver was het meest onder de indruk van de resultaten bij de patienten uit groep IV: „*This is far greater than I have previously attained with irradiation alone in stage IV cases*”.

Aan het eind van deze opsomming van klinische waarnemingen en interpretaties van resultaten, komen wij tot de slotsom, dat toevoeging van MTX aan radiotherapie bij tumoren in het hoofd-halsgebied waarschijnlijk de resultaten verbetert. In verband hiermee deelde KRAMER (1969) mee dat op het moment in Amerika (Jefferson Medical Center) gewerkt wordt aan een groot onderzoek betreffende de combinatie van MTX en radiotherapie bij uitgebreide tumoren (T_3 en T_4) in het hoofd-halsgebied. MTX zal, in verband met de gebleken geringe toxiciteit, in een dosering van 25 mg intraveneus om de twee dagen worden gegeven tot een totaal van 5 doses. Op de dag na de vijfde dosis zal met radiotherapie worden begonnen. De bedoeling is, dat ± 1200 patienten bij dit onderzoek worden betrokken, waarvan de vijf-jaarsoverleving zal worden bepaald. Pas dan kan, op statistische gronden, gekonkludeerd worden of de combinatietherapie een verhoogde overlevingskans biedt.

2. Beschouwingen over deze literatuurgegevens

Indien de gunstige effecten van MTX, zoals dit blijkt uit de vorige hoofdstukken, nog eens worden opgesomd, dan komen wij tot de volgende punten:

1. Verkleining van de tumor.
2. Potentiëring van het röntgeneffect.
3. Vermindering van de „oxygen enhancement ratio”.
4. Het achterwege blijven van tumorherstel tussen de röntgenbestralingen in.
5. Bovendien hangen de punten 1 t/m 4 zeer nauw met elkaar samen.

Ad. 1. Door het afnemen in grootte van een tumor bij MTX-therapie, zal een ingestelde radiotherapie beter effect hebben. Immers bij een verminderde hoeveelheid tumorcellen zal eenzelfde dosis stralen een grotere kans op genezing geven. Een ander, reeds eerder genoemd punt, is de aanwezigheid van anoxische cellen in een tumor. De meeste tumoren bevatten tussen 10% en 20% anoxische cellen (CLIFTON, 1966; HEWITT, 1967; VAN PUTTEN, 1968). Door de relatief hoge radioresistentie van deze anoxische cellen zullen zij voor het grootste gedeelte de kurabiliteit bepalen. Recent is bij proefnemingen gebleken, dat elimi-

nering van de goed geoxygeneerde tumorcellen door bestraling gevolgd werd door een toeneming van de oxygenatie van de overlevende anoxische cellen (MAEDA en SUIT, 1965; THOMLINSON, 1966; VAN PUTTEN en KALLMAN, 1966). Dat deze reoxygenatie afhankelijk is van de soort tumor toonde van PUTTEN (1968) in experimenten met een transplantaat muize-osteosarcoom C22LR aan. Hierbij trad na gefractioneerde röntgenbestraling geen reoxygenatie van de overblijvende anoxische cellen op. We mogen aannemen dat evenals bij een door röntgenbestraling kleiner geworden tumor de oxygenatie verbeterd, eenzelfde effect optreedt als de tumor door cytostatica kleiner wordt.

Ad 2. De experimenten van BERRY toonden duidelijk aan, dat bij gelijktijdige toepassing van MTX en röntgenstralen een duidelijke potentiëring optreedt. De meest voor de hand liggende verklaring hiervoor ligt in het feit, dat de zich delende cellen voor langere tijd in de metafase verkeren. De röntgenstralen zouden dan meer effect sorteren.

Ad 3 en 4. De potentiërende invloed van MTX op bestraling van anoxische cellen is duidelijk gebleken, evenals het onvermogen tot celherstel tussen de röntgenfrakties in (BERRY, 1968). Beide mechanismen zijn van veel waarde en behoeven verder geen toelichting.

De grote voordelen van de gelijktijdige toediening van MTX en bestraling zijn gelegen in het feit, dat zowel van punt 1 (een kleinere tumor geeft betere bestralingsvoorwaarden en door de dan verbeterde oxygenatie een betere radiosensibiliteit) als van de punten 2 t/m 4 (potentiëring op bestraling; verminderde „oxygen enhancement ratio” en onvermogen tot celherstel tussen bestralingen in) volledig gebruik gemaakt wordt. Een nadeel van de gelijktijdige toediening is de invloed van de straling op de gezonde weefsels. Deze normale cellen zullen zich ook moeilijker herstellen van de nadelige invloed van de bestraling (CONDIT, 1964). Ook zullen toxische verschijnselen meer voorkomen, eenvoudig omdat MTX langer gegeven wordt. Een typisch voorbeeld van toepassing van MTX voor en tijdens de bestraling wordt in de publikatie van SOUTHARD, KRAMER en MANSFIELD (1967) weergegeven.

De andere vorm van combinatietherapie, waarbij MTX alleen vóór de bestraling gegeven wordt (een voorbeeld hiervan is de publikatie van FRIEDMAN en DALY, 1969) benut van de onder 1 t/m 4 genoemde MTX-effecten eigenlijk alleen maar punt 1.

Als de klinische resultaten eens nader onder de loep genomen worden, dan komen we, althans wat de grotere series betreft, tot de volgende samenvatting (blz. 36).

Indien deze resultaten met elkaar vergeleken worden, dan mag men konkluderen, dat er geen duidelijk verschil tussen beide vormen van combinatie bestaat, ondanks het feit dat gelijktijdige toediening van

Auteur	Aantal patienten	Kombinatievorm	Resultaat
Condit 1966	12	MTX en gelijktijdig radiotherapie 5 × per week	gemiddelde tumorregressie 7½ maand
	9	MTX en gelijktijdig radiotherapie 2 × per week	gemiddelde tumorregressie 5½ maand
	7	MTX en gelijktijdig radiotherapie 3 dagen achtereen hooggedoseerd	gemiddelde tumorregressie 15½ maand
Kligermann 1966	11	MTX, daarna radio- therapie	gemiddelde overleving 7 maand
	11	alleen radiotherapie	gemiddelde overleving 5½ maand
Southard, Kramer 1969	57	MTX en gelijktijdig radiotherapie	3-jaarsoverleving 32% („local clearance rate”: 61%)
Friedman, Daly 1969	104	MTX, daarna radio- therapie	2-jaarsoverleving 35% („local clearance rate”: 56%)

MTX en radiotherapie theoretisch betere kansen biedt. Het is dan ook een gelukkig feit te noemen, dat de verschillende auteurs op grond van hun ervaring op het gebied van de combinatietherapie, tot één manier van combinatie gekomen zijn, te weten: intraveneuze toediening van 25 mg MTX iedere derde dag gedurende 5 keer, gevolgd door een volledige radiotherapeutische tumorbehandeling. Op deze manier worden duidelijk minder toxische reacties gezien, terwijl het effect op de tumor niet duidelijk van andere toedieningsvormen verschilt. Hierbij moet wel opgemerkt worden, dat deze toedieningswijze in strijd is met de experimenten van BERRY.

Tenslotte blijft er nog het probleem van interpretatie der gevonden resultaten. Zijn de resultaten van de gekombineerde therapie beter dan die van radiotherapie alleen? Er bestaan enkele manieren om te trachten achter de waarheid te komen. Dit is bijvoorbeeld mogelijk bij patienten met multiële lymfkliermetastasen. Eén lymfklierpakket wordt met MTX en bestraling behandeld, terwijl een ander lymfklierpakket van radiotherapie verstoken blijft. Later, als de laatstgenoemde lymfklier weer uitgroeit, wordt alleen radiotherapie gegeven. FRIEDMAN (1969) beschrijft twee van dergelijke patienten en vermeldt, dat er een duidelijk verschil in resultaat, ten gunste van de gekombineerde therapie, bestaat. Een andere manier is het geven van MTX tezamen met een subletale dosis aan bestraling. Indien MTX een potentiërende werking heeft, dient een letaal bestralingseffect verkregen te worden. FRIEDMAN

(1969) paste deze methode toe op 17 patienten. Tien ervan reageerden goed, doch 7 patienten onvoldoende. Hij zag daarna af van verdere toepassing. Een derde manier is het vergelijken van resultaten van de gekombineerde therapie met retrospectieve resultaten van radiotherapie alleen. De moeilijkheid is echter om vergelijkbare groepen te vinden. Het is duidelijk, dat een bepaalde serie met veel T_1 , T_2 -tumoren een beter resultaat bij bestraling geeft dan een groep patienten voornamelijk bestaand uit T_3 , T_4 -tumoren en die met MTX gekombineerd met bestraling wordt behandeld. Toch is het interessant in dit verband twee publikaties uit de literatuur aan te halen. De eerste is die van FRIEDMAN, SOUTHARD en ELLETT (1959). Zij beschreven 143 patienten met uitgebreide tumoren in het hoofd-halsgebied. Deze patienten werden volgens de supervoltage-rotatietechniek bestraald. De samenstelling van de groep patienten, wat betreft de lokalisatie van de tumor was als volgt: neus en nasopharynx (18), intraoraal (19), sinus paranasales (12), speekselklieren (7), tonsillen (22), tong (21), pharynx (30) en larynx (18). De „overall arrest rate”, wat waarschijnlijk te vergelijken is met de „local clearance rate” bedroeg na 2, 3 en 5 jaar respectievelijk 38, 33 en 29. Deze cijfers liggen toch beduidend lager dan 64,5% (SOUTHARD, KRAMER, 1969) en 56% (FRIEDMAN). Een tweede publikatie verscheen van de hand van ANSFIELD en medewerkers (1970). Zij vergeleken twee groepen patienten met elkaar. De eerste groep bestond uit 66 patienten met uitgebreide intraorale tumoren en tumoren van de tonsillen. Deze groep kreeg alleen radiotherapie. De tweede groep bestond uit 68, ongeveer identieke patienten. Zij werden met 5-fluorouracil en radiotherapie behandeld. De auteurs kwamen, wat betreft de patienten, die alleen radiotherapie kregen tot een 1½-, 3- en 5-jaarsoverleving van respectievelijk 40,6% \pm 6,3%, 18,8% \pm 5,7% en 15,0% \pm 5,6%.

Als deze cijfers weer met de grotere series van KRAMER en FRIEDMAN vergeleken worden, dan valt een duidelijk beter resultaat op ten gunste van de gekombineerde therapie. Hoewel steeds weer de cijfers en klinische indrukken in het voordeel van de gekombineerde therapie uitvallen, moeten we voorlopig zeer voorzichtig zijn met de interpretatie hiervan. Slechts een goed opgezet onderzoek met grote aantallen patienten, waarvan iedere patient volgens hetzelfde schema wordt behandeld, zal leren of de combinatietherapie werkelijk betere vruchten afwerpt. Het is daarom een gelukkig feit, dat in Amerika (JEFFERSON MEDICAL CENTER) men met een dergelijk onderzoek is begonnen.

Tot slot komen we op grond van de tot nu toe gevonden waarnemingen tot de volgende wensen:

- a. Voor het effect genoemd onder 1 (blz. 34): vóór de bestraling zo groot mogelijk tumoreffect met zo weinig mogelijk toxiciteit.
- b. Voor de factoren 2 en 3 (blz. 34): een serumconcentratie MTX van >30 $\mu\text{g/ml}$ op het moment van de bestraling.

Hieruit volgt het doseringschema:

Op grond van *a* wordt voor de bestraling MTX toegediend in een dosering van 25 mg intraveneus om de twee dagen tot een totaal van 125 mg.

Op grond van *b* wordt op de dag na de 5e injectie met radiotherapie begonnen. Tijdens de bestralingsperiode wordt een dosering MTX gegeven, afhankelijk van klinische toestand en toxische verschijnselen van de patient, zodanig dat een voldoende hoge weefselconcentratie bereikt wordt op het moment van bestraling. Hiertoe wordt 4 uur voor de bestraling $2\frac{1}{2}$ mg MTX per os gegeven (figuur 6). Dit doseringsschema, bedoeld om met een minimum aan toxische verschijnselen een zo hoog mogelijke concentratie MTX in het weefsel te bereiken, houdt dan wel in dat belemmering van tumorgroei tussen de bestralingen in (punt 4, blz. 34) gering zal zijn.

In januari 1964 werd in de Chirurgische afdeling van het Akademisch Ziekenhuis te Groningen met de gekombineerde therapie begonnen. In aanmerking kwamen patienten die aan de volgende voorwaarden voldeden:

1. De prognose was dubia door lokalisatie en/of type van de tumor.
2. Het moest mogelijk zijn om al het bekende tumorweefsel een voldoende dosis radiotherapie te geven.
3. De algemene toestand moest redelijk zijn.
4. Er mocht geen nierfunctiestoornis bestaan.

Aangezien MTX bij vele patienten slechts enkele uren in het serum aanwezig blijft en een continue serumconcentratie van groot belang is voor de werkzaamheid van het preparaat, werd MTX strikt op de voorgeschreven tijden toegediend. De standaarddosis aan het begin van de therapie was: 3 dd. $2\frac{1}{2}$ mg MTX oraal gegeven om 8, 14 en 20 uur.

In verband met de grote toxiciteit was een zeer nauwkeurige observatie van de patient noodzakelijk. Derhalve werden de volgende maatregelen genomen:

1. Vanaf het begin de mond schoonhouden ondermeer door spoelen met Emser-zoutoplossing na de maaltijden en voor het slapen gaan.
2. Het dragen van een gebitsprothese zoveel mogelijk beperken; bij de eerste reactie in de mond werd het dragen van een gebitsprothese verboden.
3. Leuko- en thrombocyten werden dagelijks geteld. Haemoglobinebepaling en algemeen urineonderzoek vonden driemaal per week plaats.
4. Er moest verder nauwkeurig gelet worden op:
 - algemene konditie
 - laesies van lippen en mondholte
 - slikklachten
 - diarree, maag- en buikklachten
 - haaruitval
 - balanitis en vulvovaginitis
 - huidverschijnselen: purpura, erytheem, necrosehaardjes. (meestal

- gelokaliseerd op de rug, armen en benen, doch ook wel in het gezicht)
- koorts

Het ontstaan van toxische verschijnselen had uiteraard zijn invloed op het doseringsschema van het cytostaticum. Het volgende beleid werd daarom vastgesteld:

Vermindering van de dagelijkse dosis MTX tot 2 dd. $2\frac{1}{2}$ mg
(om 8 en 20 uur) indien:

- het aantal leukocyten daalde onder 4000 per mm^3
- òf het aantal thrombocyten daalde onder 150.000 per mm^3
- òf zodra er meer dan een geringe toxische reactie ontstond

Vermindering van de dagelijkse dosis MTX tot 1 dd. $2\frac{1}{2}$ mg
(om 8 uur) indien:

- het aantal leukocyten daalde onder 2500 per mm^3
- òf het aantal thrombocyten daalde onder 100.000 per mm^3
- òf een ernstige toxische reactie van slijmvliezen in de mond of elders ontstond
- òf zodra een ongunstige reactie in de algemene toestand werd waargenomen.

Staken van de dagelijkse dosis MTX, indien:

- het aantal leukocyten daalde onder 1500 per mm^3
- òf het aantal thrombocyten daalde onder 75.000 per mm^3
- òf een zeer ernstige lokale reactie optrad
- òf een belangrijke teruggang in de algemene toestand werd waargenomen.

Met radiotherapie werd begonnen:

- indien een sterke toxische reactie het nodig maakte met MTX te stoppen en zodra de algemene toestand weer goed was
- òf in andere gevallen na ± 10 dagen.

Indien na 10 dagen slechts een geringe reactie op MTX werd waargenomen, werd met MTX in een dosering van 1 dd. $2\frac{1}{2}$ mg (8 uur) tot het einde van de bestraling c.q. tot het optreden van ernstige toxische reacties, doorgegaan. Dagelijkse bestraling vond om ongeveer 12 uur plaats.

Indien na 10 dagen geen reactie op MTX werd gezien, werd met 2 dd. $2\frac{1}{2}$ mg (8 en 20 uur) tot het einde van de bestraling c.q. het optreden van ernstige toxische reacties, doorgegaan. Dagelijkse bestraling vond om ongeveer 12 uur plaats.

Tevens diende men goed te bedenken, dat

- combinatie met corticosteroiden gekontraïndiceerd was

- bij iedere complicatie (o.a. ontstekingen) het dikwijls noodzakelijk was om de dagdosis te verlagen of MTX te stoppen.

Toen bleek, dat bovengenoemde methode vaak frappante resultaten liet zien, werd deze therapie ook bij een aantal patienten gebruikt, waarbij in verband met de aard van de tumor besloten werd tot een voorbestraling met een operatie. De gebruikelijke röntgenbestraling werd nu op bovengenoemde wijze met MTX gekombineerd.

Bewerking van de gegevens verkregen bij 33 patienten behandeld tussen 1964 en 1969

In de periode van 1964 tot en met 1969 werden op de afdeling Heelkunde van het Akademisch Ziekenhuis Groningen 33 patienten met MTX en radiotherapie, op de manier als vermeld in Hoofdstuk V, behandeld. Deze patienten hadden allen gemeen, dat het tumoren betroffen, die in het hoofd-halsgebied waren gelegen. Deze tumoren werden om verschillende redenen lokaal inoperabel geacht. Het betreft hier dus een groep patienten met een zeer slechte prognose. Deze patienten werden hetzij tot hun dood, hetzij minimaal 2 jaar klinisch vervolgd.

A. SAMENSTELLING VAN DE GROEP VAN 33 PATIENTEN

1. *Verdeling naar geslacht*

Er werden 10 vrouwen en 23 mannen behandeld.

2. *Verdeling naar leeftijd*

Deze wordt aan de hand van fig. 10 weergegeven.

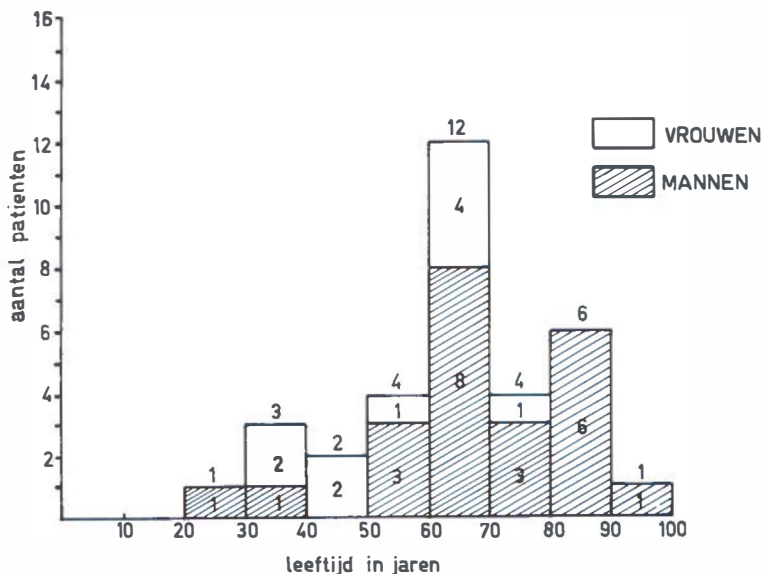


Fig. 10. Leeftijdsverdeling bij de 33 patienten.

De meeste patiënten waren tussen de 60 en 90 jaar oud. De gemiddelde leeftijd bedroeg 64,6 jaar.

3. *Verdeling naar tumorlokalisatie en pathologisch-anatomische diagnose*

Lokalisatie:	Totaal aantal:	Diagnose:	Aantal:
Gelaat	7	Carcinoma planocellulare	6
		Carcinoma basocellulare	1
Glandula parotis	3	Carcinoma solidum	1
		Pseudomucineus cystadenocarcinoom	1
		Cylindroma malignum	1
Glandula submandibularis	1	Cylindroma malignum	1
Glandula thyreoidea	4	Anaplastisch carcinoom	3
		Carcinoma solidum	1
Mond	6	Carcinoma planocellulare	6
Tong	6	Carcinoma planocellulare	6
Tonsil	1	Carcinoma planocellulare	1
Nasopharynx	1	Carcinoma planocellulare	1
Mandibula	3	Osteosarcoma	1
		Reticulosarcoma	2
Maxilla	1	Osteosarcoma	1

Samenvattend werden dus de volgende pathologisch-anatomische diagnosen gesteld:

carcinoma planocellulare	20
adenocarcinoma	5
osteosarcoma	2
reticulosarcoma	2
cylindroma malignum	2
pseudomucineus cystadenocarcinoma	1
carcinoma basocellulare	1

Zoals verwacht is het plaveiselcelcarcinoom verre in de meerderheid.

4. *Vorm van therapie, voorafgaande aan de combinatietherapie.*

Uit het voorgaande blijkt dat de groep van 33 patiënten van zeer heterogene samenstelling was. Voordat deze patiënten in aanmerking kwamen voor combinatietherapie, onderging een aantal van hen reeds één of meer behandelingen van hun maligne gezwel:

Chirurgische therapie	11
Radiotherapie	1
Chirurgische therapie + radiotherapie	9
(Geen eerdere therapie	12)

Globaal was dus één derde van het totale aantal patiënten primair inoperabel. Het overige tweede deel is, ondanks voorafgaande behandeling, inoperabel geworden.

B. KLINISCHE WAARNEMINGEN

1. *Toxische verschijnselen*

De ernst van de toxische verschijnselen werd in 4 graden onderverdeeld, t.w.:

graad 0: geen enkel verschijnsel,

graad 1: geringe verschijnselen, zoals stomatitis, diarree etc.,

graad 2: ernstige verschijnselen waardoor MTX-toediening gestopt moest worden,

graad 3: zeer ernstige verschijnselen waardoor een direct levensbedreigende toestand ontstond.

Indien de toxische verschijnselen aldus worden geclassificeerd, dan bleek dat zij in de volgende frequentie voorkwamen:

33 *patienten*:

eerste behandeling

graad 0: 8 pat.

graad 1: 15 pat.

graad 2: 9 pat.

graad 3: 1 pat. (overleden)

In de groep van 33 patiënten bevonden zich 9 patiënten, die tweemaal een combinatietherapie met MTX en radiotherapie ondergingen. Hierbij werden de volgende waarnemingen gedaan:

9 *patienten*

twee behandelingen

Tijdens 1e behandeling	Tijdens 2e behandeling	Aantal pat.
graad 0	graad 1	2
graad 0	graad 2	1
graad 1	graad 1	3
graad 1	graad 2	1
graad 1	graad 3	1
graad 2	graad 3	1 (overleden)

Uit vorenstaande cijfers worden twee belangrijke konklusies getrokken.

In de eerste plaats is MTX, op deze manier toegepast, een zeer toxisch middel. Zowel in de groep van 33 patienten als in de groep van 9 patienten overleed 1 patient. Beide patienten vielen in de oude leeftijdsgroep, resp. 76 en 81 jaar. Ze overleden aan pancytopenie. Bij beide patienten bestond geen preëxistent nierlijden. De derde patient met een graad 3-toxiciteit was 64 jaar en overleefde deze ernstige complicatie.

In de tweede plaats valt op, dat toediening van MTX voor de tweede keer volgens hetzelfde schema bij 6 van de 9 patienten een duidelijk ernstiger toxiciteitsbeeld gaf.

2. Overleving

De overlevingsduur van alle patienten is met enkele relevante gegevens in tabel 1 vermeld. In de rubriek „voorafgaande therapie” wordt weer-gegeven welke vorm van behandeling de patient reeds eerder voor zijn afwijking heeft ondergaan. „P” betekent primair en wil zeggen dat de patient geen eerdere therapie heeft ontvangen. Iedere „C” geeft een voorgaande chirurgische behandeling aan en iedere „R” een radio-therapeutische. De tussen haakjes geplaatste getallen in de kolom „overleving in maanden” geven de overlevingstijden na een tweede behandeling met MTX en bestraling aan. Deze tweede behandeling werd in alle gevallen voor tumorgroei buiten het oorspronkelijk behandelde gebied gegeven.

Bij na-onderzoek van de 33 patienten bleek, dat 13 patienten (39%) een overlevingstijd gelijk aan of langer dan 2 jaar hadden. Hierbij waren 10 patienten die geen tumor meer in het behandelde gebied of naaste omgeving hadden en 2 of meer jaar overleefden. Hiervan waren 8 patienten geheel tumorvrij. De overige 2 patienten hadden metastasen op afstand. Deze cijfers komen vrijwel overeen met die van FRIEDMAN en SOUTHARD c.s.

Samenvattend kan, wat betreft overlevingstijd en lokale tumorgroei, het volgende worden gekonstateerd:

Overlevingstijd	Aantal	Percentage
2 of meer jaar	13	39
2 of meer jaar; lokaal tumorvrij	10	30
2 of meer jaar; totaal tumorvrij	8	24

Bij vergelijken van de tweejaarsoverleving van 39% bij de eigen patienten met de overleving na alleen bestraling van een ongeveer vergelijkbare groep patienten (ANSFIELD, 1970), waarbij een tweejaars-

Tabel 1 Overzicht overleving van alle behandelde patienten

Patient	Leeftijd	Tumorlokalisatie	P.A.	Voorafgaande therapie	Overleving in mnd.	In leven
1. v.d.B.	82	gelaat	carc. planocell.	CCC	9	neen
2. G.	62	gelaat	carc. planocell.	R + CC	17 (10)	neen
3. Ha.	61	gelaat	carc. planocell.	C	11	neen
4. H.K.	64	gelaat	carc. planocell.	C + R	7 (3)	neen
5. Wi.	67	gelaat	carc. planocell.	CCC	20	neen
6. Wo.	83	gelaat	carc. planocell.	P	21 (12)	neen
7. A.K.	78	gelaat	carc. basocell.	CCCC	27	ja
8. d.B.	83	mond	carc. planocell.	P	24	ja
9. He.	61	mond	carc. planocell.	P	28	ja
10. Ka.	56	mond	carc. planocell.	R + C	25	neen
11. Kr.	85	mond	carc. planocell.	P	6	neen
12. Vo.	73	mond	carc. planocell.	C	4	neen
13. v.d.Z.	91	mond	carc. planocell.	R	44 (21)	neen
14. B.-W.	75	tong	carc. planocell.	CC + R	2	neen
15. B.-R.	40	tong	carc. planocell.	P	4	neen
16. F.	69	tong	carc. planocell.	R + C	48	ja
17. d.J.	81	tong	carc. planocell.	P	14 (0)	neen
18. S.	83	tong	carc. planocell.	P	9	neen
19. V.	76	tong	carc. planocell.	C	0	neen
20. D.	66	tonsil	carc. planocell.	P	17 (16)	neen
21. T.	55	nasopharynx	carc. planocell.	CC	61	ja
22. Ho.	82	parotis	carc. solidum	CC	8	neen
23. Si.	35	parotis	pseudomuc. cyst-adenocarc.	R + C	16 (7)	neen
24. M.-D.	39	parotis	cylindroma	CC	24	ja
25. K.	64	submandibularis	cylindroma	CCC	41 (29)	neen
26. J.-J.	61	schildklier	carc. anapl.	P	4	neen
27. O.-v.W.	68	schildklier	carc. anapl.	P	11	neen
28. P.-d.R.	59	schildklier	carc. anapl.	C + R	14	neen
29. v.D.-W.	65	schildklier	carc. solidum	R + C	26 (6)	neen
30. S.-S.	39	mandibula	osteosarcoma	CC	44	neen
31. F.-t.D.	47	mandibula	reticulosarcoma	P	50	ja
32. Sm.	60	mandibula	reticulosarcoma	P	22	neen
33. J.	25	maxilla	osteosarcoma	CCC + R	74	ja

overleving werd gevonden die ligt tussen 40,6% (1½ jaar) en 18,8% (3 jaar), lijkt na gekombineerde therapie een gunstiger effect op te treden.

Van de 9 patienten, die voor een tweede keer behandeld werden, bleek niemand meer in leven te zijn.

Van belang is de vraag of er verschil in resultaat bestaat bij patienten, die primair of secundair MTX en radiotherapie kregen. Bij de patienten die minstens 2 jaar tumorvrij bleven (10 patienten) werden de volgende waarnemingen gedaan: 3 van deze patienten werden primair en de

overige 7 patienten secundair behandeld. Het totale aantal primair c.q. secundair behandelde patienten bedroeg 12 c.q. 21 (tab. 1). In percentages uitgedrukt komt dit neer op 25% en 33%, zodat de secundair behandelde iets gunstiger afsteken. Worden alleen de 8 patienten die minstens 2 jaar overleefden en daarbij geheel tumorvrij bleven bij dit onderzoek betrokken, dan bedragen de percentages 25 (3/12) en 24 (5/21).

Een andere benaderingswijze is nog om na te gaan of de gemiddelde overlevingsduur van de overleden primair c.q. secundair behandelde patienten verschilt:

Primair	Secundair		Totaal
	<i>C</i>	<i>C + R; R</i>	
13 mnd. (9 pat).	17 mnd. (8 pat.)	17 mnd. (8 pat.)	16 mnd. (25 pat.)

Gemiddeld bleken dus de secundair behandelde patienten die overleden zijn 4 maanden langer te leven, waarbij het geen verschil maakt of de eerdere behandeling alleen chirurgisch of chirurgisch en radiotherapeutisch was.

Konkluderend blijkt uit vorenstaande gegevens dat bij deze serie patienten, onder wie velen reeds metastasen regionaal of op afstand hadden, een lokaal tumorvrije, 2-jaarsoverleving van 30% alleszins vergelijkbaar is met de resultaten in enkele andere grote centra. Zonder dat deze gegevens voor statistische bewerking in aanmerking komen, wordt van de resultaten gezegd (FRIEDMAN; SOUTHARD c.s.), dat ze beter zijn dan wanneer alleen radiotherapie gegeven zou zijn.

3. *Het lokale behandelingsresultaat*

Zoals reeds werd opgemerkt bevonden onze patienten zich in een gevorderd stadium van kanker, zodat de overleving moeilijk als maatstaf kan gelden voor het resultaat van de behandeling. Een belangrijk criterium voor de waarde van therapie is, of in het behandelde gebied geen recidief ontstaat; in de literatuur wordt dit (FRIEDMAN, 1969; SOUTHARD c.s., 1969) „local clearance” genoemd. Met dit begrip wordt dan slechts bedoeld, dat het behandelde gebied op het moment van overlijden of controle klinisch vrij van tumor gebleven is. Het probleem hierbij is echter waar men de grenzen wil trekken. In de literatuur bestaat hierover geen eenstemmigheid. Immers de patient die aan longmetastasering overlijdt, maar net buiten het behandelde gebied tumorgroei heeft, is vrij van tumor in het behandelde gebied. Deze

patient heeft dan een zg. „randrecidief”. Wij beschouwen dit als een falen van de behandeling (geen „local clearance”).

Een juiste beoordeling van genezing in het behandelde gebied is uiterst moeilijk. Na de behandeling is pathologisch-anatomische controle dat geen tumorweefsel meer aanwezig is, controversieel. Men weet immers niet welk gedeelte van het behandelde gebied representatief voor beoordeling van het resultaat zou kunnen zijn. Bovendien is het maken van een defekt in bestraald weefsel weinig aantrekkelijk. Er rest dan slechts nauwkeurige klinische controle van het behandelde gebied, waarbij als enig criterium voor lokale genezing het blijvend ontbreken van suspekthe verschijnselen (recidief) geldt.

Van alle patienten is het aspect van de tumor- (en) in het bestraalde gebied nagegaan vanaf het moment dat de radiotherapeut de behandeling beëindigde. Wat betreft dit lokale aspect kunnen zich vijf mogelijkheden voordoen:

- 1e. De tumor reageert niet of nauwelijks op c.q. groeit door, ondanks de behandeling.
- 2e. De tumor verdwijnt klinisch en recidiveert niet.
- 3e. De tumor verdwijnt aanvankelijk klinisch geheel, doch recidiveert in het behandelde gebied, hierna het „lokale recidief” genoemd.
- 4e. De tumor verdwijnt aanvankelijk klinisch geheel, doch recidiveert op de rand van of in de onmiddellijke nabijheid van het behandelde gebied, hierna „randrecidief” genoemd.
- 5e. De tumor verdwijnt, doch op enige afstand van het behandelde gebied ontwikkelt zich nieuwe tumorgroei.

Eerst werd getracht de patienten 2 tot 6 weken na het beëindigen van de radiotherapie te beoordelen, waarbij speciaal aandacht aan de situatie in het behandelde gebied werd besteed. Aan de hand van de afneming in tumorgrootte werd het resultaat als goed of slecht betiteld. Een goede reactie op bestraling hield in, dat van het oorspronkelijke tumorvolume klinisch slechts 1/4 of minder aanwezig leek te zijn. De reactie werd slecht genoemd als meer dan 1/4 van het oorspronkelijke tumorvolume overgebleven was.

Het resultaat van deze eerste controle wordt hieronder schematisch weergegeven.

33 patienten *Eén behandeling*

Goed	24 patienten
Slecht	3 patienten
Niet beoordeeld	6 patienten

9 patiënten
Twee behandelingen

Tijdens 1e behandeling	Tijdens 2e behandeling	Aantal patiënten
goed	goed	6
goed	slecht	2
slecht	goed	1

Duidelijk is, dat in beide groepen bijna driekwart van het aantal tumoren goed op de behandeling reageerde.

Een interessant probleem is de vraag of er verband bestaat tussen de ernst van de toxische verschijnselen en de reactie van de tumor op bestraling. De toxische verschijnselen zouden een maat kunnen zijn voor een bepaalde serumspiegel of tolerantie van de weefsels van de patient. Hoewel wij wel eens de indruk hadden dat sterke toxische reacties gepaard gingen met een goede tumorregressie, blijkt dit niet bij bewerking van de gegevens. Indien nl. de reactie van de tumor (42 x) op behandeling wordt uitgezet tegen de toxiciteitsgraad, dan ontstaat de volgende tabel:

Tabel 2 Combinatie van toxiciteitsgraad en tumorreactie op bestraling van 42 tumoren bij 33 patiënten

Tumorreactie op bestraling	Toxiciteitsgraad				Totaal
	0	1	2	3	
Goed	6	13	10	2	31 tumoren
Slecht	1	2	1	1	5 tumoren
Onbekend	1	5	0	0	6 tumoren
Totaal	8	20	11	3	42 tumoren

Bij de beoordeling van het lokale resultaat op langere termijn beschouwen wij twee series behandelingen. De eerste serie betreft 33 patiënten bij wie de tumor voor de eerste keer werd behandeld. De tweede serie omvat 9 patiënten bij wie opnieuw ontstane tumorgroei voor een tweede keer werd behandeld.

De lokale resultaten van de behandeling in de eerste serie kunnen als volgt worden weergegeven:

Onvolledige tumorregressie op bestraling	1
Volledige tumorregressie, daarna klinisch tumorvrij gebleven	15
„Lokaal recidief”	3
„Randrecidief”	11
Tumorgroei op enige afstand van bestraald gebied	2
Onbekend tumorgedrag	1
Totaal: 33 patiënten	

Hieraan moet volledigheidshalve worden toegevoegd, dat zich onder de categorie „lokaal recidief” één patient bevindt (pat. no. 23 Si., gedetailleerd beschreven op blz. 59), die voor behandeling van een recidief na chirurgische therapie van een mucoepidermoid parotiscarcinoom een volledige MTX-kuur kreeg, gevolgd door een röntgen-vóórbestraling en operatie. De tumor recidiveerde echter, waarna een volledige gekombineerde behandeling volgde. Hierop verdween de tumor makroskopisch (biopsieën negatief bij p.a-onderzoek!). Deze patient heeft dus wel een volledige MTX-kuur ondergaan, doch geen volledige radiotherapie bij de eerste behandeling.

De lokale resultaten bij de tweede serie patienten, kunnen als volgt worden samengevat:

Resultaat behandeling I	Resultaat behandeling II	Aantal pat.
Lokaal goed; „Randrecidief”	Klinisch tumorvrij	2
Lokaal goed; „Randrecidief”	Onvolledige tumorregressie	5
Lokaal goed; „Tumorgroei op enige afstand”	Onvolledige tumorregressie	1
„Lokaal recidief” (Pat. no. 23 Si.)	klinisch tumorvrij	1
Totaal:		9

Bij deze gegevens komen duidelijk twee feiten naar voren:

1. Het hoge aantal „randrecidieven”.

Na de eerste gekombineerde behandeling bij de 33 patienten, blijken 11 randrecidieven (33%) voor te komen, terwijl slechts 3 patienten een lokaal recidief kregen en 1 patient een onvolledige tumorregressie toonde (samen 12%). Hoewel in de literatuur geen vergelijkbare cijfers te vinden zijn, lijkt dit toch een hoog percentage. De verklaring hiervoor ligt waarschijnlijk in het feit, dat bij de radiotherapie een te klein gebied is bestraald. Mogelijk is dit een gevolg van de omstandigheid, dat bij het begin van de radiotherapie de tumor reeds kleiner was geworden en de radiotherapeut een bestralingsgebied afgrensde, dat afgestemd was op het volume van de reeds geslonken tumor. Een andere mogelijkheid zou kunnen zijn, dat de dosering stralen in het behandelde gebied naar de periferie afneemt, zodat een duidelijk verschil in dosering tussen het centrum en de randen van het bestraalde gebied heeft bestaan.

2. Een duidelijk verschil in tumorregressie na bestraling tussen de patienten die voor het eerst en degenen die voor de tweede keer met MTX en radiotherapie werden behandeld.

In de eerstgenoemde serie van 33 patiënten werd immers bij 1 patiënt een onvolledige tumorregressie na behandeling gevonden, benevens drie „lokale recidieven”. In de tweede serie van 9 patiënten toonden 5 van de 7 „randrecidieven” na de eerste behandeling, een onvolledige tumorregressie na een tweede behandeling. Bij de patiënt met „tumorgroei op enige afstand” van het eerst behandelde gebied werd ook een onvolledige tumorregressie gezien.

Hieruit valt op te maken, dat het resultaat van behandeling van een randrecidief door middel van een tweede gekombineerde behandeling teleurstellend is. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat door de eerste therapie een selectie van tegen deze behandeling resistente tumorcellen is opgetreden. Bovendien kan het randrecidief ook ingroeien in het reeds bestraalde gebied, waar minder vascularisatie en dus slechtere zuurstofvoorziening bestaat. Bestraling van een dergelijk gebied geeft slechtere resultaten.

De konsekwentie uit de bovenstaande punten 1 en 2 is, dat bij behandeling van patiënten met een tumor in het hoofd-halsgebied met MTX en radiotherapie een groot gebied bestraald moet worden, rekening houdend met het oorspronkelijke volume van de tumor (STAM, 1971) en de uitgebreid infiltratieve groei van deze tumoren. Ook bij chirurgische therapie na behandeling met MTX heeft men soortgelijke ervaring opgedaan (ROUTLEDGE, 1971). Het resultaat van behandeling van een eventueel recidief is duidelijk slechter.

Bij de bepaling van de „local clearance rate” bij onze groep van 33 patiënten wordt gevonden, dat 17 patiënten (52%) tot deze categorie behoren. Dit getal lijkt in dezelfde orde van grootte als die van FRIEDMAN. Zijn „local clearance rate”, bij een controle tot 2 jaar, bedroeg 56 maar voor de prognostisch slechte tumoren 42. En tot deze laatste categorie behoren waarschijnlijk ook onze eigen 33 patiënten. KRAMER (1969) kwam bij controle tot 3 jaar tot 61%. Hierbij werd echter geen percentage van de prognostisch slechte tumoren vermeld. In 1967 kwamen SOUTHARD c.s. bij bepaling van de „local clearance” bij dezelfde groep patiënten als KRAMER (1969) na 1½ jaar tot 44%. Hierbij bleek „local clearance” te betekenen, dat de patiënt 1½ jaar moest hebben overleefd en lokaal tumorvrij was gebleven. Bij toepassing van dit criterium op de groep van de eigen 33 patiënten blijkt dit cijfer na 2 jaar 36% te bedragen (12 van de 33 patiënten). Dit percentage steekt dus iets ongunstig af tegen dat van SOUTHARD c.s.

Bij vergelijking van de „local clearance rate” van de eigen patiënten, bij controle na 2 jaar, met een groep alleen bestraalde patiënten (FRIEDMAN, SOUTHARD, ELLETT (1959), blz. 37), valt een gunstiger effect op van de gekombineerde therapie (52% kontra 38%).

C. ENKELE ILLUSTRATIEVE GEVALLEN

1. *Met pathologisch-anatomisch onderzoek van het behandelde gebied*

Zoals reeds gezegd kon pathologisch-anatomisch onderzoek slechts bij enkele patienten geschieden. Dit kwam enerzijds, omdat het overlijden bijna altijd thuis plaatsvond. Aan de andere kant was het nemen van weefsel uit een pas bestraald gebied controversieel.

Dat dit onderzoek niet altijd heeft kunnen plaats vinden, moet uit wetenschappelijk oogpunt ernstig worden betreurd. Het zou een objectieve beoordeling van het effect van de lokale behandeling zijn. Bij 4 patienten werd toch histologisch onderzoek verricht. Daar deze gegevens zeer waardevol zijn, zullen de ziektegeschiedenissen in het kort worden vermeld.

Patient nr. 2. G. 62 jaar

De voorgeschiedenis van deze patient vermeldt, dat hij werd bestraald voor een plaveiselcelcarcinoom rechts aan de onderlip. In juni 1966 ontstond een submandibulaire lymfkliermetastase rechts, waarvoor een halsklierdissectie en wigexcisie van het vroeger bestraalde lipcarcinoom plaatsvond. In oktober 1966 ontstond opnieuw tumorgroei rechts submandibulair, waarvoor patient nu radiotherapie ontving. Een fistelend proces ontstond op de plaats van bestraling. Voor

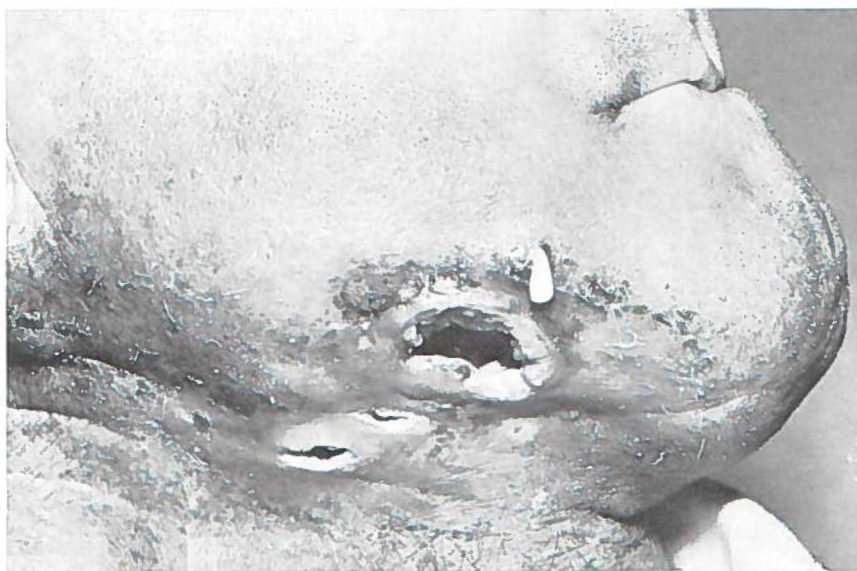


Foto 1. Pat. G. 62 jaar (No. 2). Recidief na een alleen radiotherapeutisch behandeld lipcarcinoom.

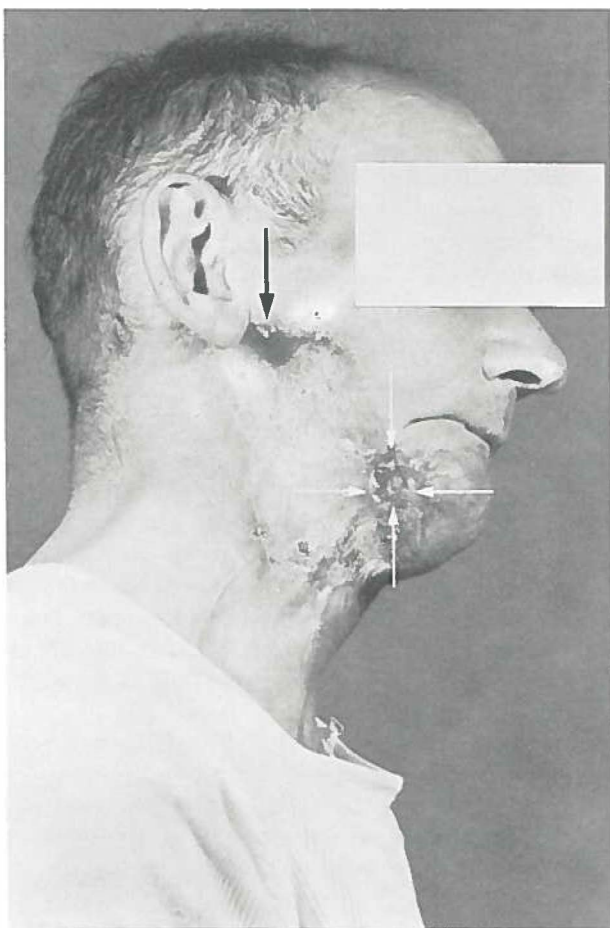


Foto 2. Pat. G. 62 jaar (No. 2). Status 6 maanden na MTX en radiotherapie.

behandeling van dit proces werd patient naar het Akademisch Ziekenhuis Groningen verwezen.

Bij deze eerste ziekenhuisopneming in juni 1967 te Groningen bleek, dat het fistelend proces een lokaal recidief na de radiotherapie was (foto 1). Er werd een hemimandibulectomie met verwijdering van het tumorrecidief verricht, daar de tumor in het bot was geïnfiltreerd. Bij pathologisch-anatomisch onderzoek kwam naar voren, dat één der sneevlakken niet vrij was van carcinoom. Bij de tweede ziekenhuisopneming in augustus 1967, werd het niet-vrije sneevlak ruim geëxci-deerd. Ook nu weer bleek bij pathologisch-anatomisch onderzoek één der sneevlakken niet vrij van tumorweefsel te zijn. In oktober 1967 bleek rechts submentaal een maligne ulcus van 2×4 cm te bestaan,

waarvan de patholoog-anatoom meedeelde, dat het een plaveiselcelcarcinoom was. Een röntgenfoto van de rechter mandibulastomp toonde een suspekt beeld voor tumorinfiltratie. Ziekenhuisopneming volgde, waarbij, gezien de slechte prognose, met MTX en bestraling werd begonnen. Het maligne ulcus reageerde goed op de therapie, zodat de patient verder poliklinisch kon worden behandeld. Bij controle in april 1968 was het ulcus ongeveer half zo groot (foto 2, witte pijlen) als voor de behandeling. Echter onder het rechter oor was een defektje van 1×1 cm ontstaan (foto 2, zwarte pijlen). Een biopsie hieruit liet carcinoma planocellulare zien. Wederom werd besloten tot (de vierde) opneming in het ziekenhuis. Het tumorrecidief onder het rechter oor (op de grens van de in 1967 uitgevoerde hemimandibulectomie) werd met MTX en radiotherapie behandeld. Daar patient klaagde over hevige pijn in het defekt rechts aan de kin (foto 2, witte pijlen) werd besloten dit ulcus met onderliggende mandibulastomp te excideren en te behandelen met een splitskingraft. De pathologisch-anatomische diagnose luidde: (nr. 264415) „*We ontvingen een 6-tal kleine, vrij vaste weefselbrokjes. Mikroskopisch onderzoek toont dood botweefsel, bindweefsel en spierweefsel met bestralingseffekten. Geen aanwijzingen voor maligniteit of specificiteit*”. Het verdere beloop was ongunstig. Hij overleed aan het recidief onder het rechter oor, daar dit slecht op de gekombineerde therapie reageerde. Er werd helaas geen obductie verricht.

Het bizondere van deze patient is, dat de tumor onder de kin (foto 2, witte pijlen) een lokaal recidief na radiotherapie was, maar waarin na de gekombineerde therapie geen tumorweefsel meer werd aangetoond. Het tumorrecidief onder het rechter oor reageerde slecht op de tweede gekombineerde behandeling.

Patient nr. 8. d. B. 83 jaar

De voorgeschiedenis van deze patient vermeldt geen bijzonderheden van betekenis.

Hij werd in februari 1969 opgenomen in het Akademisch Ziekenhuis Groningen in verband met een tumor links onder de tong (foto 3). Onder de linker kaakhoek bevond zich een vaste tumor, uiterst suspekt voor een kliermetastase. Een biopsie uit het ulcus toonde een carcinoma planocellulare. Gezien deze bevindingen zou patient in aanmerking komen voor een mondbodemresectie en halsklierdissectie.

Gezien zijn leeftijd van 83 jaar was daaraan aangepaste behandeling geïndiceerd. De tumor in de mondbodem en de suspekte halsklier werden met MTX en radiotherapie behandeld. Mocht de tumor goed op deze therapie reageren, dan zou enkele maanden later een (minder belastende) halsklierdissectie volgen. De tumor reageerde inderdaad zeer goed op de therapie. Na MTX toediening werd de intumescentie

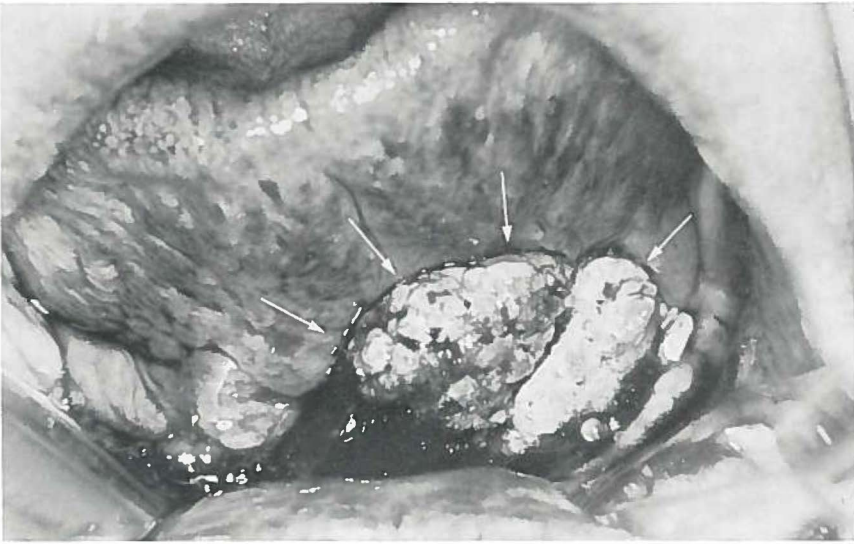


Foto 3. Pat. d.B. 83 jaar (No. 8). Mondbodemcarcinoom voor behandeling.

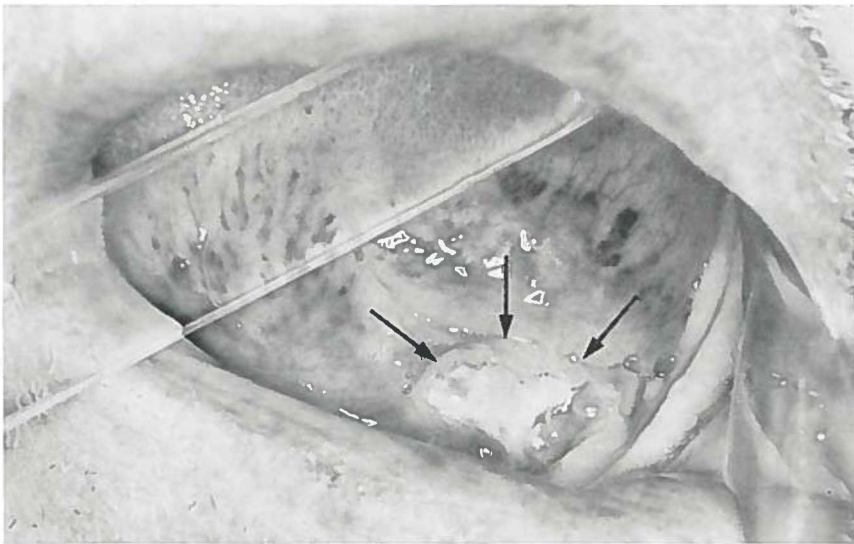


Foto 4. Pat. d.B. 83 jaar (No. 8). Status na 10-daagse MTX-toediening.

in de mond zeer veel kleiner (foto 4) en na radiotherapie resteerde alleen littekenweefsel (foto 5). De algemene toestand van de patient bleef goed, zodat in juni 1969 een tweede ziekenhuisopneming volgde. In narcose werd het littekengebied in de mond (zie foto 5), geëxcideerd voor evaluatie, alvorens werd besloten tot halsklierdissectie. De opera-

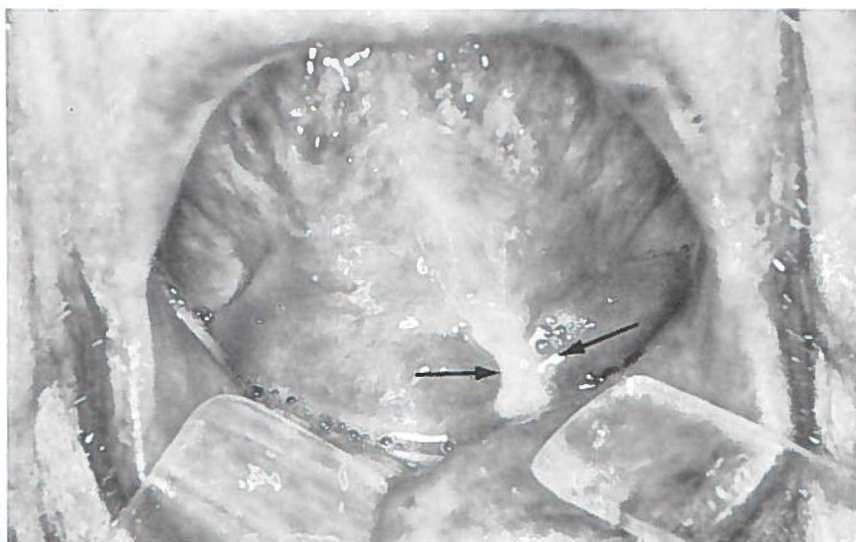


Foto 5. Pat. d.B. 83 jaar (No. 8). Status 2 maanden na MTX en radiotherapie.

tie verliep zonder moeilijkheden en de patient werd in goede toestand ontslagen.

Opmerkelijk en buiten verwachting is de uitslag van het pathologisch-anatomisch onderzoek van het geëxciideerde littekengebied uit de mondbodem (nr. 280662):

„Van een proefexcisie uit de mondbodem werd een bijna 3 cm lang weefselstukje ontrangen. Mikroskopisch onderzoek van enkele coupes op verschillend niveau toont onder het gawe slijmvlies littekenweefsel met enig ontstekingsinfiltraat. Er is echter geen lokaal recidief van het carcinoom in deze proefexcisie aanwezig.”

(In het halsklierdissectiepreparaat werd geen tumorweefsel gevonden). Patient was op het moment van controle 2 jaar na de behandeling in leven, in goede konditie en zonder lokaal recidief.

Patient nr. 19. V. 76 jaar

De voorgeschiedenis van deze patient vermeldt, dat in september 1965 een plaveiscelcarcinoom van het linkergedeelte van de tong met radiumimplantatie werd behandeld. In januari 1966 ontdekte hij een zwelling links in de hals. Deze tumor bleek uiterst suspekt voor een halskliermetastase van het behandelde tongcarcinoom. Ziekenhuisopneming volgde. Een halsklierdissectie links werd uitgevoerd. Pathologisch-anatomisch onderzoek liet een metastase van een planocellulair carcinoom zien. De dissectie leek radikaal. Bij controle van de patient

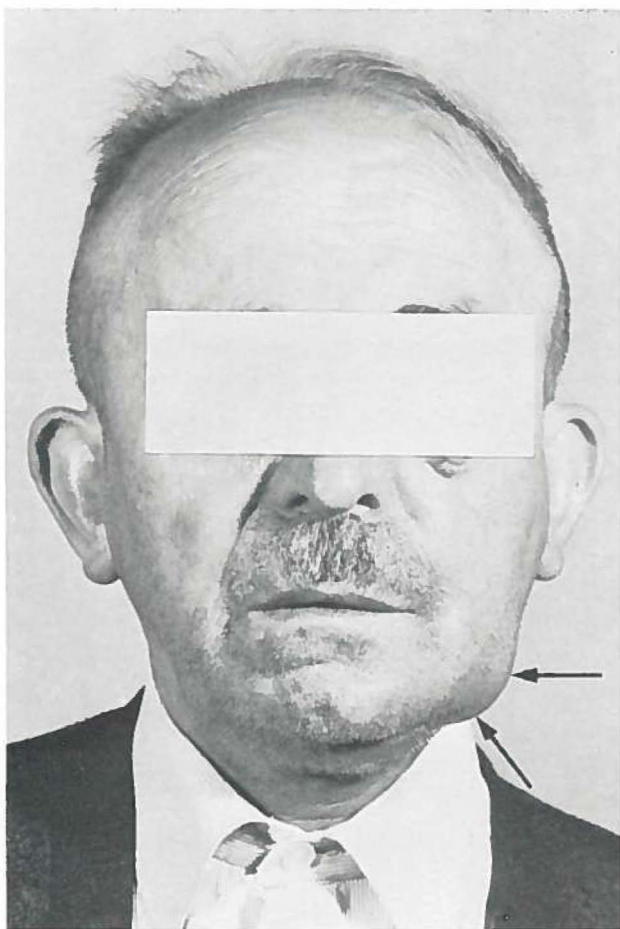


Foto 6. Pat. V. 76 jaar (No. 19). Recidief van een tongcarcinoom na halsklierdissectie.

in augustus 1966 bleek submentaal links een snel in grootte toenemende zwelling te ontstaan (foto 6). Deze zwelling was kenmerkend voor maligne tumorgroei. De tweede ziekenhuisopneming volgde. Hierbij bleek, dat de tumor in mandibula en mondbodem geïnfilteerd was. Tevens bestond er een klein fisteltje. Gezien de uitgebreidheid van de tumor en de leeftijd van de patient werd tot MTX en radiotherapie besloten. Na 10 dagen, waarbij in totaal 60 mg MTX werd gegeven, begon de radiotherapie. De MTX-toediening werd gestaakt. Na drie bestralingen van 300 R per zitting (foto 7), ontwikkelde zich een pancytopenie en twee dagen na de laatste bestraling overleed de patient onder het beeld van toxische shock. Bij deze patient kon obductie worden verricht. Het verslag hiervan is zeer opvallend (S 19030):

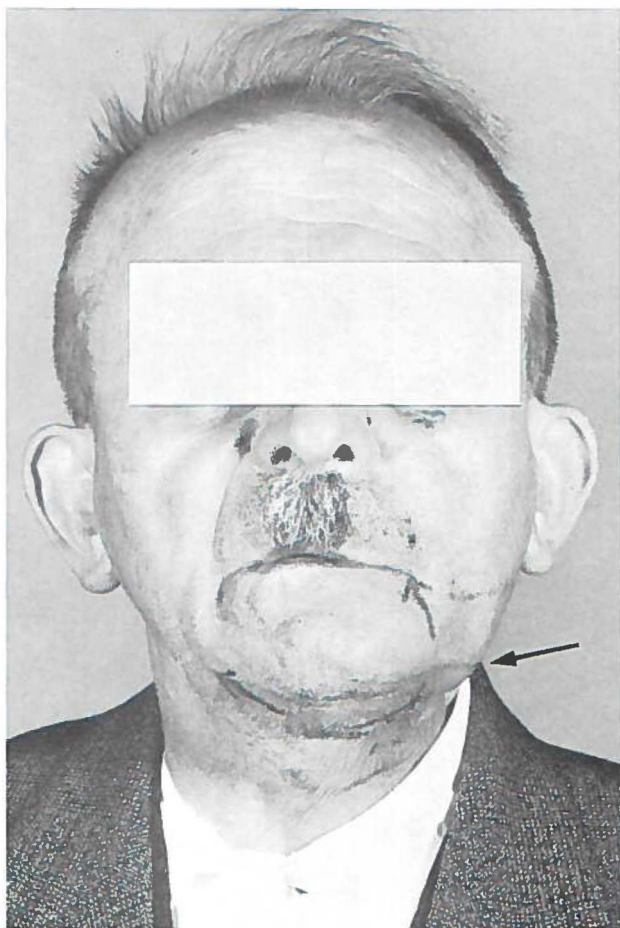


Foto 7. Pat. V. 76 jaar (No. 19). Status na 10-daagse MTX-kuur en radiotherapie ($3 \times 300 \text{ R!}$).

„Bij deze patient, indertijd behandeld voor een carcinoma planocellulare cornificans van de tong, konden nergens meer sporen van deze tumor worden aangetoond. Patient toonde huidbloedingen en een bloeding in de linker bijnier. Waarschijnlijk zijn dit uitingen van de gevonden hypoplasie van het rode beenmerg (thrombopenie). Verder vonden we een infarcering van een deel van het colon ascendens. Er was een sterke arteriosclerose vooral van de abdominale aorta, zodat een vrij acuut ontstane stoornis in de bloedvoorziening van de dikke darm waarschijnlijk lijkt. Mogelijk heeft de klinisch bestaan hebbende shock een grote rol gespeeld. Een infectieproces, dat de toxische shock zou hebben verklaard, kon niet worden gevonden. Het enigszins gedilateerde hart toonde lichte myofibrose. Verder werd een gering longoedeem waargenomen.”

De histologische bevindingen pleiten voor de mogelijkheden van de gekombineerde therapie.

Patient nr. 23, Si. 35 jaar

De voorgeschiedenis van deze patient vermeldt radiotherapie voor een hemangioom rechts hoog in de hals. In maart 1968 onderging patient elders een partiële parotidectomie voor een carcinoom van de rechter glandula parotis. In juni 1968 ontstond een perifere n.facialis-

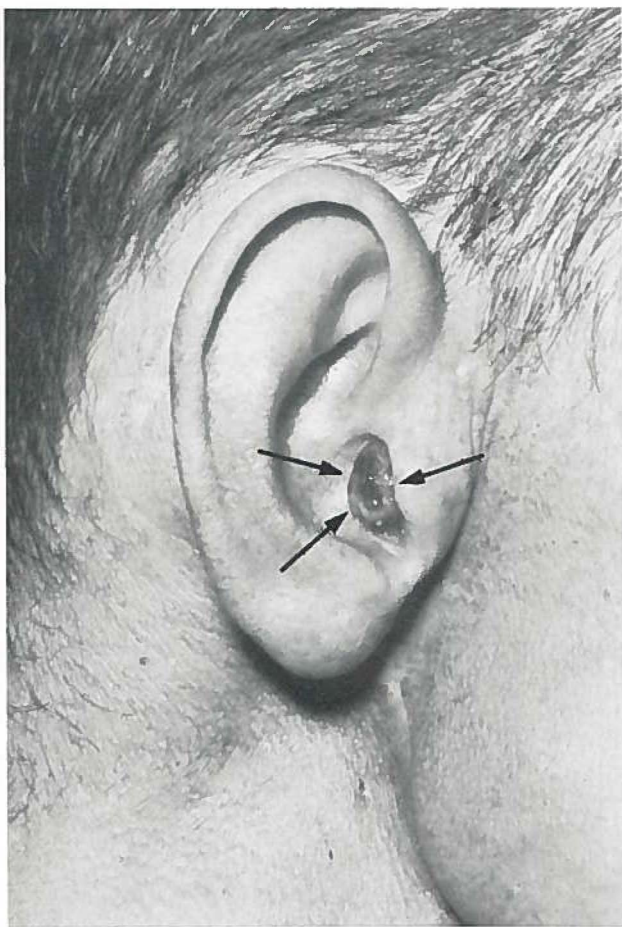


Foto 8. Pat. Si. 35 jaar (No. 23). Recidief van een parotiscarcinoom na chirurgische behandeling (2 ×) en radiotherapie.

verlamming. Bij onderzoek werd ook een $2\frac{1}{2} \times 2\frac{1}{2}$ cm grote, vaste tumor gevonden, welke onder het operatielitteken was gelegen. Een recidief van het parotiscarcinoom was praktisch zeker. De therapie werd hierop gebaseerd. Na ziekenhuisopneming kreeg de patient MTX en een voorbestraling van 2000 R. Aansluitend onderging de patient een totale parotidectomie en halsklierdissectie. Pathologisch-anatomisch onderzoek toonde aan, dat er sprake was van een pseudomucineus cystadenocarcinoom. Hierbij bleek dat de tumorgroei zich tot in de schedelbasis had uitgestrekt. Dit gebied werd met zilverclips gemerkt. Nadat patient de operatie te boven gekomen was, kreeg hij



Foto 9. Pat. Si. 35 jaar (No. 23). Status 2 maanden na MTX en radiotherapie.

röntgennabestraling speciaal gericht op de schedelbasis. Er werd geen MTX meer gegeven. Op een gemaakte röntgenfoto in februari 1969 van de borstorganen was duidelijk longmetastasering te zien. In juni 1969 werd patient wederom opgenomen, omdat er „wild vlees” uit de rechter uitwendige gehoorgang groeide (foto 8). Een biopsie uit dit weefsel toonde carcinoom aan. Daar patient voor geen enkele therapie, anders dan MTX en radiotherapie in aanmerking kwam, werd zo snel mogelijk na ziekenhuisopneming hiermee begonnen. De tumor reageerde goed op de ingestelde therapie en na afloop van de bestraling was alleen nog een litteken aanwezig (foto 9). Om het resultaat pathologisch-anatomisch te verifiëren, werden uit dit weefsel een drietal biopsieën genomen. Het P.A.-verslag hiervan (nr. 282460) luidde:

„Mikrosopisch onderzoek van een drietal 3 mm grote weefselstukjes, afkomstig van weefsel uit de rechter gehoorgang, toont flink necrotisch weefsel, waartussen enkele polymorfe kernen van beschadigde cellen. Geen aanwijzingen voor maligniteit.”

In december 1969 werd patient in de neurologische kliniek opgenomen met een hersenmetastasering, waaraan hij is overleden. Er was lokaal geen tumorweefsel meer aanwezig. Obductie werd niet verricht.

Ook in dit geval had waarschijnlijk een groter gebied bestraald moeten worden, teneinde tumorgroei als op foto 8 te voorkomen. Wel bleek lokaal na de gekombineerde therapie pathologisch-anatomisch geen tumorweefsel meer aantoonbaar te zijn.

2. Met langdurige overleving

De volgende beschrijvingen betreffen 2 patienten die een aantal vormen van tumorbehandeling hadden ondergaan. Deze behandelingen hadden niet het verwachte resultaat. Er ontstond weer tumorgroei waarvan, door de lokalisatie, de prognose zeer slecht, zoniet infaust genoemd kon worden.

Pat. nr. 16 F. 69 jaar

De voorgeschiedenis van patient vermeldt een in 1955 met radium-implantatie behandeld carcinoom aan de linkerzijde van de tong.

In januari 1966 ontstond een tumorrecidief waarvoor patient werd opgenomen. Bij onderzoek bleek, dat de tumor in de linker mandibula was geïnfilteerd. Er waren geen aanwijzingen voor verdere metastasering. Na röntgenvoorbestraling onderging patient een commando-resectie links. Pathologisch-anatomisch onderzoek liet een carcinoma planocellulare linguae zien met infiltratie in het bot van de mandibula. De sneevlakken waren vrij van tumorweefsel. Geen tumorgroei in de halsklieren.

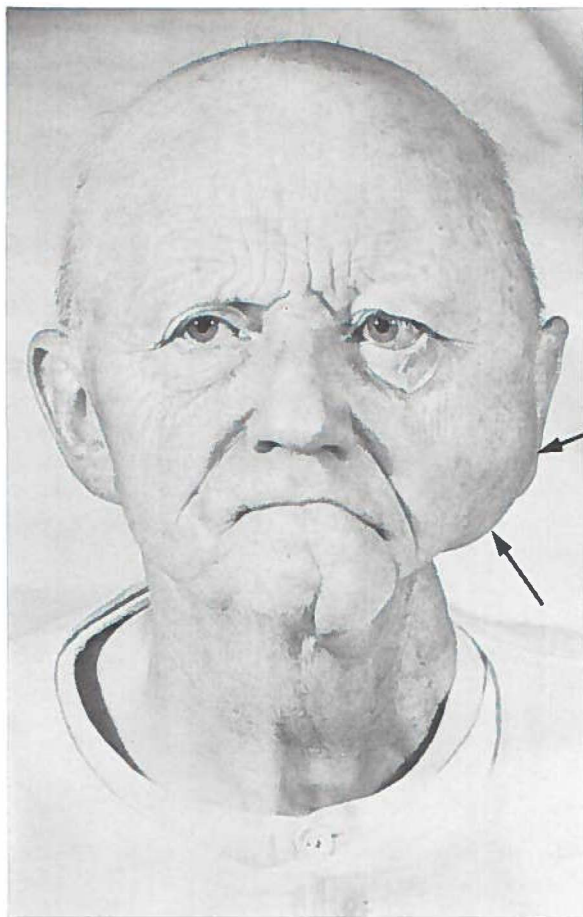


Foto 10. Pat. F. 69 jaar (No. 16). Recidief van een tongcarcinoom na radiumimplantatie en commando-resectie. Exophthalmus en facialisparesie links.

In december 1966 werd patient wederom opgenomen in verband met klachten van dubbelzien en duizeligheid. Bij onderzoek werd een exophthalmus links en een zwelling van de linkerwang (foto 10) gevonden. Er bestond een n. facialisparesie links. Onderzoek op de afdeling K.N.O. wees uit, dat er doorgroei van tumor in de linker uitwendige gehoorgang bestond. De enige therapie voor dit tweede recidief was MTX en radiotherapie. De prognose was gezien de enorme uitbreiding

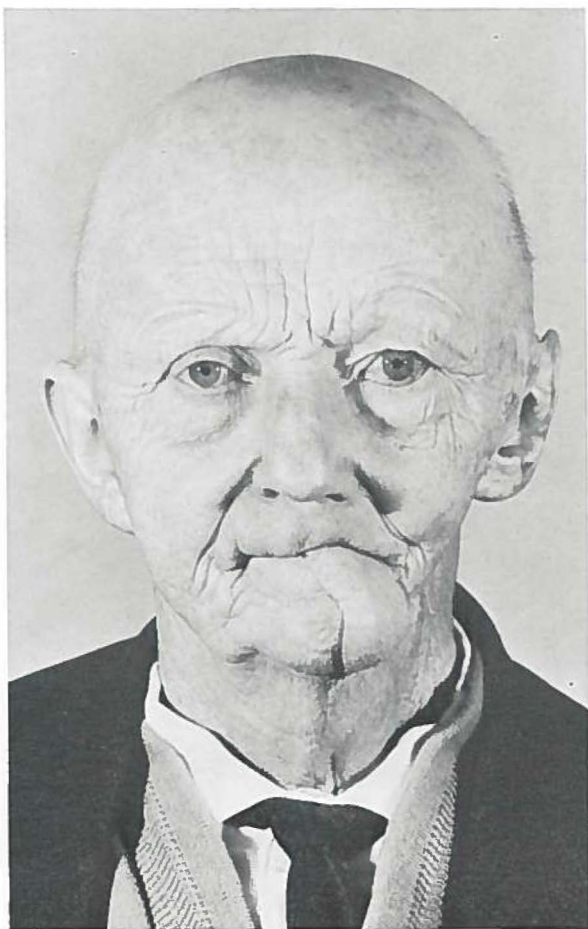


Foto 11. Pat. F. 69 jaar (No. 16). Status 20 maanden na MTX en radiotherapie.

van de tumor zeer slecht. In februari 1967 eindigde de radiotherapie. De tumorgroei was sterk teruggedaan. De algemene konditie was verbeterd. In april 1967 was de tumor klinisch verdwenen, er bestond nog wel exophthalmus en dubbelzien. In oktober 1968 was ook het hinderlijk dubbelzien verdwenen en resteerde nog een zeer lichte exophthalmus (foto 11). In december 1971, dus 5 jaar na het begin van de gekombineerde therapie, was patient nog steeds zonder klachten.



Foto 12. Pat. J. 25 jaar (No. 33). Osteosarcoom linker maxilla

Pat. nr. 33 J. 25 jaar

De voorgeschiedenis van patient vermeldt geen bijzonderheden.

In april 1964 werd patient opgenomen in verband met een osteosarcoom van de linker maxilla (foto 12). Er waren geen aanwijzingen voor metastasering van de tumor. Patient werd chirurgisch behandeld. Een maxillaresectie links vond plaats waarbij tevens, in verband met doorgroei in de linker orbita, enucleatie van het linkeroog geschiedde.



Foto 13. Pat. J. 25 jaar (No. 33). Status na maxillaresectie links, enucleatie linkeroog en excisie van recidief in linker wang en neustussenschot. Recidief in sinus sphenoidalis.

Pathologisch-anatomisch onderzoek toonde een radikaal verwijderd osteosarcoom van de maxilla met doorgroei in de orbita.

In juni en juli 1964 ontstonden recidieven in respectievelijk linkerwang en neustussenschot. Deze werden beide geëxcideerd (foto 13), waarbij de sneevlakken steeds vrij bleken van tumorweefsel. In augustus 1964 ontstond wederom een recidief, nu in de sinus sphenoidalis (p-a. aangetoond: No. 200. 752). Ook hier restte slechts één therapie



Foto 14. Pat. J. 25 jaar (No. 33). Status 7½ jaar na MTX en radiotherapie.

en wel MTX en radiotherapie. Eind september 1964 werd de radiotherapie beëindigd. Het recidief verdween, waarna patient tumorvrij bleef. Vanaf september 1965 vonden meerdere plastische rekonstrukties plaats. Ook deze patient was in december 1971, ruim 7½ jaar na de gekombineerde therapie, in goede toestand (foto 14).

Het resultaat van de gekombineerde therapie bij beide patienten mag zeer opmerkelijk genoemd worden en behoeft geen verder commentaar.

Overzichtstabel alle behandelde patienten.

No. Patiënt	Leeftijd	Geslacht	Tumorlokalisatie	P.A.-diagnose	Voorafgaande therapie
1. v.d.B.	82	M	gelaat (orbita)	carc. planocellulare	CCC
2. G.	62	M	gelaat (lip)	carc. planocellulare	R + CC
3. Ha.	61	M	gelaat (onderooglid)	carc. planocellulare	C
4. H.K.	64	M	gelaat (orbita)	carc. planocellulare	C + R
5. Wi.	67	M	gelaat (oor)	carc. planocellulare	CCC
6. Wo.	83	M	gelaat (proximale hals)	carc. planocellulare	P
7. A.K.	78	M	gelaat (neus)	carc. basocellulare	CCCC
8. d.B.	83	M	mond	carc. planocellulare	P
9. He.	61	M	mond	carc. planocellulare	P
10. Ka.	56	M	mond	carc. planocellulare	R + C
11. Kr.	85	M	mond	carc. planocellulare	P
12. Vo.	73	M	mond	carc. planocellulare	C
13. v.d.Z.	91	M	mond	carc. planocellulare	R
14. B.-W.	75	V	tong	carc. planocellulare	CC + R
15. B.-R.	40	V	tong	carc. planocellulare	P
16. F.	69	M	tong	carc. planocellulare	R + C
17. d.J.	81	M	tong	carc. planocellulare	P
18. S.	83	M	tong	carc. planocellulare	P
19. V.	76	M	tong	carc. planocellulare	C
20. D.	66	M	tonsil	carc. planocellulare	P
21. T.	55	M	nasopharynx	carc. planocellulare	CC
22. Ho.	82	M	parotis	carc. solidum	CC
23. Si.	35	M	parotis	pseudomuc. cystadenocarc.	R + C
24. M.-D.	39	V	parotis	cylindroma	CC
25. K.	64	V	submandibularis	cylindroma	CCC
26. J.-J.	61	V	schildklier	carc. anaplast.	P
27. O.-v.W.	68	V	schildklier	carc. anaplast.	P
28. P.-d.R.	59	V	schildklier	carc. anaplast.	C + R
29. v.D.-W.	65	V	schildklier	carc. solidum	R + C
30. S.-S.	39	V	mandibula	osteosarcoma	CC
31. F.-t.D.	47	V	mandibula	reticulosarcoma	P
32. Sm.	60	M	mandibula	reticulosarcoma	P
33. J.	25	M	maxilla	osteosarcoma	CCC + R

Toxiciteits- graad	In leven	Overleving in maanden	Lokaal behandelingsresultaat	Doodsoorzaak
2	neen	9	Lokaal recidief	Lokale tumorgroei
1 (1)	neen	17 (10)	I Randrecidief	Lokale tumorgroei (II)
2	neen	11	II Onvolledige tumorregressie Randrecidief	Bronchopneumonie
1 (2)	neen	7 (3)	I Randrecidief	Longmetastasen
1	neen	20	II Tumorvrij Tumorvrij	Tumorgroei op enige afstand
0 (2)	neen	21 (12)	I Randrecidief	Lokale tumorgroei (II)
1	ja	27	II Onvolledige tumorregressie Tumorvrij	—
2	ja	24	Tumorvrij	—
2	ja	28	Tumorvrij	—
1	neen	25	Randrecidief	Randrecidief
2	neen	6	Randrecidief	Randrecidief
1	neen	4	Tumorvrij	Decompensatio cordis
1 (1)	neen	44 (21)	I Randrecidief	Lokale tumorgroei (II)
1	neen	2	II Onvolledige tumorregressie	—
1	neen	4	Onbekend	Hersenmetastasering
0	ja	48	Onvolledige regressie Tumorvrij	Lokale tumorgroei —
2 (3)	neen	14 (0)	I Randrecidief	MTX-intoxicatie
2	neen	9	II Onvolledige tumorregressie Tumorvrij	Algemene malaise
3	neen	0	Tumorvrij	MTX-intoxicatie
1 (1)	neen	17 (6)	I Tumorgroei op enige afstand II Onvolledige tumorregressie	Obstructiepnemonie
1	ja	61	Tumorvrij	—
2	neen	8	Tumorvrij	Diffuse metastasering
0 (1)	neen	16 (7)	I Recidief na atypische kombinatietherapie	Hersenmetastasering
0	ja	24	II Tumorvrij Tumorvrij	—
1 (3)	neen	41 (29)	I Randrecidief	Longmetastasering
1	neen	4	II Tumorvrij Randrecidief	Randrecidief
0	neen	11	Lokaal recidief	Lokale tumorgroei
1	neen	14	Randrecidief	Randrecidief
0 (1)	neen	26 (6)	I Randrecidief	Diffuse metastasering
0	neen	44	II Onvolledige tumorregressie Tumorvrij	Longmetastasering
0	ja	50	Tumorvrij	—
2	neen	22	Tumorvrij	Tumorgroei lever en maag
1	ja	74	Tumorvrij	—

Het doel van deze „pilotstudy” was om na te gaan

- a. of de combinatie van methotrexate en radiotherapie van waarde kan zijn bij de behandeling van kanker in het hoofd-hals gebied;
- b. welke problemen zich voordoen bij deze gekombineerde behandeling en
- c. welke dosering methotrexate gewenst is en hoe de beide methoden op elkaar afgestemd moeten worden.

Ad a 1. Een experimentele basis voor de combinatie is het resultaat van het werk van BERRY (blz. 24 e.v.). Hij zag een duidelijke potentiëring van het bestralingseffekt op cellen, die aan methotrexate blootgesteld waren. Dit gold zowel onder aërobe als anaërobe omstandigheden (fig. 9).

Een ander belangrijk punt is de tumorverkleining door methotrexate; hierdoor kan van radiotherapie een beter effect worden verwacht (blz. 34 e.v.).

2. Er zijn onvoldoende gegevens over „randomized series” van gelijksoortige gevallen, waarin het resultaat van de combinatie van methotrexate met radiotherapie tegen het resultaat van andere therapie is afgewogen.
3. Er zijn gegevens dat klinische toepassing van de gekombineerde behandeling betere resultaten lijkt te geven dan radiotherapie alleen. Zowel SOUTHARD c.s. (blz. 31) als FRIEDMAN (blz. 33 e.v.) deden in hun publikaties hierover positieve uitspraken. Ook wij hebben deze indruk: slechts bij 4 van de 33 patienten (12%) ontstond een lokaal recidief (blz. 50). Deze waarneming wordt gesteund door pathologisch-anatomisch onderzoek (Hoofdstuk VI-c blz. 52 e.v.): bij 4 patienten kon het behandelde gebied onderzocht worden en in geen van deze gevallen werd nog tumorweefsel gevonden.
4. Omdat voornamelijk patienten met inoperabele processen c.q. recidieven werden behandeld, dient niet in de eerste plaats de overleving, maar de lokale genezing („local clearance”) als

maatstaf voor sukses te worden gehanteerd: deze werd bereikt in 17 van de 33 gevallen (52%).

Randrecidieven worden achteraf beschouwd als een gevolg van verkeerde interpretatie van bevindingen na de behandeling met MTX (zie b.2): deze randrecidieven werden in 11 van de 33 gevallen (33%) waargenomen.

Ad b 1. Orale toediening van de meestal werkzame dosis van 3 dd. $2\frac{1}{2}$ mg. methotrexate had veelvuldige en ernstige toxische verschijnselen gegeven, waardoor deze dosering – ook ondanks goede voorzorgen – ernstige risico's met zich meebracht en niet steeds volgens plan kon worden voltooid. De voorzorgen hielden onder meer in dat een goede selectie (algemene konditie, nierfunctiestoornissen) werd toegepast en een nauwgezette controle van bloedbeeld en klinische verschijnselen plaatsvond. Hiervoor was eigenlijk steeds ziekenhuisopneming noodzakelijk, opdat zonodig de dosering terstond aan de reactie kon worden aangepast en adequate behandeling ingesteld. Bij de eigen 33 patienten waren er slechts 8, die geen toxische verschijnselen hadden. De overige 25 patienten toonden min of meer ernstige reacties. Twee patienten overleden.

Het bleek dat bij behandeling met methotrexate voor een tweede keer ernstiger toxische verschijnselen optraden (blz. 45).

Een duidelijk verband tussen de ernst van de toxische verschijnselen en de reactie van de tumor op de therapie kon niet worden aangetoond (blz. 49).

2. Frekwent werden na de gekombineerde therapie recidieven op de grens van het bestraalde gebied (randrecidieven) waargenomen: bij 11 van de 33 patienten (33%) tegenover slechts 4 lokale recidieven (12%). Hieruit bleek dat achteraf het te bestralen gebied te beperkt gekozen was. Aangezien het waarschijnlijk is dat deze onjuiste beslissing een gevolg was van een aanzienlijke verkleining van het oorspronkelijke gezwel op het tijdstip dat met radiotherapie werd begonnen, dient het te behandelen gebied exakt te worden vastgesteld, voordat tot enige therapie wordt overgegaan (STAM, 1971).

Het resultaat van een tweede gekombineerde behandeling bleek duidelijk slechter te zijn dan van een eerste behandeling (blz. 50 e.v.).

Ad c Het doel van het combineren van methotrexate met radiotherapie is om met zo weinig mogelijk toxische verschijnselen:

α. een zo sterk mogelijke teruggang van de tumor te verkrijgen en

- β. van de potentiërende werking van methotrexate gedurende de radiotherapie optimaal gebruik te maken.

Om deze beide doeleinden te bereiken, wordt voor de toekomst het volgende schema voorgesteld:

- ad α. Hiervoor wordt een inductieperiode aanbevolen, waarin methotrexate intraveneus wordt gegeven in een dosering van 25 mg. ineens om de twee dagen tot een totaal van 5 injecties („mini-split-course chemotherapy” van KRAMER, 1969 blz. 32 e.v.). Op de dag na de laatste injectie wordt met radiotherapie begonnen.
- ad β. Hiertoe wordt aanbevolen dat slechts op het moment van bestraling een zo hoog mogelijke weefselconcentratie aan methotrexate aanwezig is (BERRY). Daartoe lijkt, met een geringe kans op toxische verschijnselen, het geven van $2\frac{1}{2}$ mg. per os \pm 4 uur voor het tijdstip van iedere bestraling, optimaal (SULLIVAN, fig. 6).

Gekombineerde therapie volgens deze richtlijnen lijkt hoopvolle perspectieven te bieden.

The purpose of this pilot study was to determine

- a. whether the combination of methotrexate and radiotherapy can be of benefit in the treatment of cancer of the head and neck;
- b. what problems are encountered during this combined treatment and
- c. what is the maximum dosage of methotrexate and how the two methods should be adjusted one to the other.

- ad a 1. Experimental basis for this combination is to be found in Berry's work (page 24 et. seq.). He saw a distinct potentiation of the effect of irradiation on cells exposed to methotrexate. This occurred in aerobic as well as in anaerobic conditions (fig. 9).

Another important aspect is the decrease of the volume of the tumor under the influence of methotrexate; as a result, a better effect of radiotherapy is to be expected (page 34 et seq.).

2. Insufficient data are available concerning randomized series of similar cases in which the result of the combination of methotrexate and radiotherapy has been compared with the results of other therapy.
3. Data are available which suggest that the clinical application of the combined method of treatment gives better results than radiotherapy alone. Positive statements to this effect are found in the publications of SOUTHARD et al. (page 31) and of FRIEDMAN (page 33 et seq.). We, also, have this impression: a local recurrence was seen only in 4 out of 33 patients (12%) (page 50). This observation is corroborated by pathological examination (Chapter VI-c, page 52 et seq.): the area treated could be examined in 4 cases, and in none of these cases was further tumor tissue found.
4. Since those treated were mostly patients with inoperable processes and recurrences, the chief criterion of success should not be the survival but the local clearance: this was achieved in 17 out of 33 cases (52%).

Marginal recurrences are retrospectively interpreted as errors of evaluation after treatment with MTX (see b.2): these occurred in 11 of the 33 cases (33%).

- ad b 1. The oral administration of the usually effective dose of 3×2.5 mg. methotrexate per day had frequently given rise to serious toxic symptoms. This dosage therefore – even with the best of care – incurred serious risks and could not always be completed as planned. The precautions included adequate selection (general condition, disorders of renal function) and accurate control of the blood picture and clinical symptoms. In fact hospitalization was always necessary, so that if reactions occur, the dosage could be adjusted immediately and adequate treatment instituted. Among our own 33 patients there were only 8 who did not exhibit toxic symptoms. The other 25 patients showed more or less serious reactions. Two patients died.

It had been found that a second course of methotrexate treatment causes more severe toxic symptoms (page 45).

No distinct correlation between the severity of the toxic symptoms and the reaction of the tumor to the treatment could be demonstrated (page 49).

2. Recurrences at the margin of the area irradiated (marginal recurrences) were frequently seen after the combined therapy, viz. in 11 of the 33 patients (33%) as against only 4 local recurrences (12%). In retrospect, this shows that the irradiated area had been too small. Since this incorrect decision was probably the consequence of the considerable decrease of the volume of the original tumor at the start of radiotherapy, the area to be treated must be defined accurately before commencing any treatment (STAM, 1971).

The result of a second course of combination treatment was clearly less good than that of a first course (page 50 et seq.).

- ad c The purpose of the combination of methotrexate with radiotherapy is to achieve with a minimum of toxic phenomena:
- α. maximal regression of the tumor and
 - β. optimal use of the potentiated action of methotrexate during the radiotherapy.

In order to fulfil both purposes, the following scheme is proposed:

- ad α. A period of induction is recommended during which 25 mg of methotrexate is given in a single intravenous injection every third day, to a total of 5 injections ('mini-split-course

chemotherapy' according to KRAMER, 1969, page 32 et seq.). Radiotherapy is started on the day following the last injection.

- ad β. It is advisable that a maximal tissue concentration of methotrexate should be present only at the time of the irradiation (BERRY). The optimum method, with a small risk of toxic phenomena is the administration of 2.5 mg. orally approx. 4 hours prior to the start of every session of irradiation (SULLIVAN, fig. 6).

Combined therapy according to these directions seems to offer encouraging prospects.

Literatuur

- ANGIER, R. B., BOOTHE, J. H., HUTCHINGS, B. L., MOWAT, J. H., SERUB, J., STOKSTADT, E. L. R., SUBBAROW, Y. en WALLER, W. - The structure and synthesis of the liver L. casei-Factor. *Science* 103: 667, 1946.
- ANSFIELD, F. J., RAMIREZ, G., DAVIS, H. L., KORBITZ, B. C., VERMUND, H. en GOLLIN, F. F. - Treatment of advanced cancer of the head and neck. *Cancer*, 25: 78, 1970.
- ANSFIELD, F. J. - Cancer Chemotherapy. Boerhaave Series 132, 1971.
- BAGSHAW, M. A. - Possible role of potentiators in radiation therapy. *Amer. J. Roentgenol.* 85: 822, 1961.
- BASERGA, A. en MARINONE, G. - Megamyeloid cells and aminopterin. *Letters to editor, The Lancet* 1065, 3 dec. 1949.
- BERRY, R. J. - Modification of radiation effects. *Radiol. Clin. North America* 3: 249, 1965.
- BERRY, R. J. - Effects of some metabolic inhibitors on X-ray dose-response curves for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated X-ray doses. *Brit. J. Radiol.* 39: 458, 1966.
- BERRY, R. J. - Some observations on the combined effects of X-rays and methotrexate on human tumor cells in vitro with possible relevance to their most useful combination in radiotherapy. *Amer. J. Roentgenol. Rad. Ther. and Nucl. Med.* 102: 509, 1968.
- BERRY, R. J. en ANDREWS, J. R. - Modification of radiation effect on mammalian tumour cells by pharmacological agents. *Nature (London)* 196: 185, 1962.
- BURCHENAL, J. H., BABCOCK, G. M., BROQUIST, H. P. en JUKES, T. J. - Prevention of chemotherapeutic effects of 4-amino-N¹⁰-methylpteroylglutamic acid on mouse leukemia by citrovorum factor. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 76: 735, 1951.
- CARTWRIGHT, G. E., FAY, J., TATTING, B. en WINTROBE, M. - Pteroylglutamic acid deficiency in swine: effects of treatment with pteroylglutamic acid, liver extract and protein. *J. Lab. and Clin. Med.* 33: 397, 1948.
- CLARYSSE, A. M., CATHEY, W. J., CARTWRIGHT, G. E. en WINTROBE, M. M. - Pulmonary disease complicating intermittent therapy with methotrexate. *J. Amer. Med. Ass.* 209: 1861, 1969.
- CLIFTON, K. H., BRIGGS, R. C. en STONE, H. B. - Quantitative radiosensitivity studies of solid carcinomas in vivo: methodology and effect of anoxia. *J. Nat. Cancer Inst.* 36: 965, 1966.
- CONDIT, P. T., CHANES, R. E. en JOEL, W. - Renal toxicity of methotrexate. *Cancer* 23: 126, 1969.
- CONDIT, P. T., LEVITT, S. H., SNOW, J. R., KNOX, G. S., WILLIAMS, G. R., BOGARDUS, C. R. en EATON, B. G. - Combination chemotherapy and radiation therapy of squamous cell carcinoma of head and neck. *Tr. Am. Acad. Ophth.* 70: 627, 1966.
- CONDIT, P. T., RIDINGS, G. R., COIN, J. W., WILLIAMS, G. R., MITCHELL, D. en

- BOLES, G. W. - Methotrexate and radiation in treatment of patients with cancer. *Cancer Res.* 24: 1524, 1964.
- DELIHAS, N., RICH, M. A. en EIDNOFF, M. L. - Radiosensitization of a mammalian cell line with 5 - bromodeoxyuridine. *Radiation Res.* 17: 479, 1962.
- FARBER, S., DIAMOND, L. K., MERCER, R. D., SYLVESTER, R. F. en WOLFF, J. A. - Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist 4-amino-pteroylglutamic acid (aminopterin). *New Engl. J. Med.* 238: 787, 1948.
- FERGUSON, F. C., THIERSCH, J. B. en PHILIPS, F. S. - Action of 4-amino-N¹⁰-methyl-pteroylglutamic acid in mice, rats and dogs. *J. Pharm. and Exp. Ther.* 98: 293, 1950.
- FOUNTAIN, J. R., HUTCHISON, D. J., WARING, G. B. en BURCHENAL, J. H. - Persistence of amethopterin in normal mouse tissues. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 83: 369, 1953.
- FOUNTAIN, J. R., WARING, G. B., HUTCHISON, D. J. en BURCHENAL, J. H. - Distribution of amethopterin in normal mouse tissues following intravenous injection. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 81: 193, 1952.
- FRANKLIN, A. L., BELT, M., STOKSTADT, E. L. R. en JUKES, T. H. - Biological studies with 4-amino-N¹⁰-methylpteroylglutamic-acid. *J. Biol. Chem.* 177: 631, 1949.
- FRANKLIN, A. L., JUKES, T. H., STOKSTADT, E. L. R. en BELT, M. - Pteroylglutamic-acid deficiency in the dog as produced by „X-methyl“-pteroylglutamic acid. *Fed. Proc.* 8: 199, 1949.
- FRANKLIN, A. L., STOKSTADT, E. L. R., BELT, M. en JUKES, T. H. - Biochemical experiment with a synthetic preparation having an action antagonistic to that of pteroylglutamic acid. *J. Biol. Chem.* 169: 427, 1947.
- FREEMAN-NARROD, M. - The pharmacology of methotrexate. *Methotrexate in the treatment of cancer I* J. Wright and Sons, Bristol., 1962.
- FRIEDMAN, M. - The treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck with combined methotrexate and irradiation. *Front. Radiation Ther. Onc.* Karger, Basel/New York 4: 106, 1969.
- FRIEDMAN, M. en DALY, J. F. - Combined irradiation and chemotherapy in treatment of squamous cell carcinoma of head and neck. *Amer. J. Roentgenol., Rad. Ther. and Nucl. Med.* 90: 246, 1963.
- FRIEDMAN, M., SOUTHARD, M. E. en ELLETT, W. - Supervoltage (2MEV.) rotation irradiation of carcinoma of the head and neck. *Amer. J. Roentgenol.* 81: 402, 1959.
- GOODMAN, L. S. en GILMAN, A. - The pharmacological basis of therapeutics. Ed. III, Collier & MacMillan, London 1970.
- GRAY, L. H. - The modification by chemical agents of biological response to irradiation. Conference of research on the radiotherapy of cancer. American Cancer Society 1960.
- HEWITT, H. B., CHAN, D. P. S. en BLAKE, E. R. - Survival curves for clonogenic cells of a murine keratinizing squamous carcinoma irradiated in vivo or under hypoxic conditions. *Int. J. Radiat. Biol.* 12: 535, 1967.
- HIGGINS, G. M. - Effect of folic acid on toxicity of its analogue 4 - aminopteroylglutamic acid. *Blood* 4: 1142, 1949.
- HODNETT, E. M. - Drugs used with radiation in the treatment of cancer. *Cancer Chemother. Rep.* 32: 55, 1963.
- HOLTHUSEN, H. - Beiträge zur Biologie der Strahlenwirkung; Untersuchungen an Ascarideneiern. *Arch. Ges. Physiol.* 187: 1, 1921.
- HUSEBY, R. A. en DOWNING, V. - The use of methotrexate orally in treatment of squamous cancers of the head and neck. *Cancer Chemother. Rep.* 16: 511, 1962.

- INNES, J., INNES, E. en MOORE, C. V. - The hematological changes induced in Guinea pigs by prolonged administration of pteroylglutamic acid antagonists. *J. Lab. and Clin. Med.* 34: 883, 1949.
- JACOBSON, W. - The mode of action of folic acid antagonists and the function of folic acid. Methotrexate in the treatment of cancer I. *J. Wright and Sons, Bristol* 77, 1966.
- JUKES, T. H. en BROQUIST, H. P. - Metabolic pathways. Academic Press New York II: 713, 1961.
- KLIGERMAN, M. M., HELLMAN, S., VON ESSEN, C. F. en BERTINO, J. R. - Sequential chemotherapy and radiotherapy. Preliminary results of clinical trial with methotrexate in head and neck cancer. *Radiology* 86: 247, 1966.
- KLOPP, C. T., SMITH, D. F. en ALFORD, T. C. - Palliation achieved in carcinoma of the head and neck with intra-arterial chemotherapy. *Amer. J. Surg.* 102: 830, 1961.
- KRAMER, S. - Use of methotrexate and radiation therapy for advanced cancer of the head and neck. *Front. Radiation Ther. Onc.*, Karger, Basel/New York 4: 116, 1969.
- KRISS, J. P. en REVESZ, L. - The distribution and fate of bromodeoxycytidine in the mouse and rat. *Cancer Res.* 22: 254, 1962.
- LEONE, L. A., ALBALA, M. M. en REGE, V. B. - Treatment of carcinoma of the head and neck with intravenous methotrexate. *Cancer* 21: 828, 1968.
- LEWISOHN, R., LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R. en KERESZTESY, J. C. - The influence of liver L. casei-Factor on spontaneous breast cancer in mice. *Science* 104: 436, 1946.
- LIGUORI, V. R., GIGLIO, J. J., MILLER, E. en SULLIVAN, R. D. - Effects of different dose schedules of amethopterin on serum and tissue concentrations and urinary excretion patterns. *Clin. Pharm. Ther.* 3: 34, 1962.
- LITTLE, P. A., SAMPATH, A. en SUBBAROW, Y. - The use of antagonists of pteroylglutamic acid in controlling „Rous-Chicken-Sarcoma”. *J. Lab. Clin. Med.* 33: 1144, 1948.
- MAEDA, M. en SUIT, H. D. - Radiation dose fractionation and oxygen effect in a mammary carcinoma of the C3H-mouse. Communication at XIth Int. Congr. of Radiology, Roma, Int. Congr. Series 89, Excerpta Medica Foundation, Abstr. no. 980, 1965.
- MARTIN, G. J., TOLMAN, M. G. J. en MOSS, J. - d-Methyl folic acid displacing agent for folic acid. *Arch. Biochem.* 12: 318, 1947.
- NICHOL, C. A. en WELCH, A. D. - Mechanism of action of aminopterin. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 74: 403, 1950.
- PAPAC, R., LEFKOWITZ, E. en BERTINO, J. R. - Methotrexate (NSC - 740) in squamous cell carcinoma of the head and neck. II Intermittent intravenous therapy. *Cancer Chemother. Rep.* 51: 69, 1967.
- PAPAC, R. J., JACOBS, E. M., FOYE, L. V. en DONOHUE, D. M. - Systemic therapy with amethopterin in squamous carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother. Rep.* 32: 47, 1963.
- PHILIP, J. F. - Methotrexate complementary to X-ray therapy in the treatment of advanced cancer. Methotrexate in the treatment of cancer II. *J. Wright and Sons, Bristol*, 1966.
- PUTTEN, L. M. VAN - Nieuwe inzichten in de radiotherapie en chemotherapie van tumoren door studie van tumorceloverleving. *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.* 112: 173, 1968.
- PUTTEN, L. M. VAN - Oxygenation and cell kinetics after irradiation in a transplantable osteosarcoma. Effects of radiation on cellular proliferation and differentiation. *Int. Atomic Energy Agency, Vienne*, 1968.
- PUTTEN, L. M. VAN - Tumour reoxygenation during fractionated radiotherapy;

- studies with a transplantable mouse osteosarcoma. *Europ. J. Cancer* 4: 173, 1968.
- PUTTEN, L. M. VAN EN KALLMAN, R. F. - Effects of preirradiation on the ratio of oxygenated and anoxic cells in a transplanted mouse tumor. *Communication at 3rd. Intern. Congr. of Radiation Research, Cortina d'Ampezzo, Abstr. no. 910, 1966.*
- ROSWIT, B. EN KAPLAN, G. - Nitrogen mustard as adjunct to radiation in the management of bronchogenic cancer. *Radiology* 57: 384, 1951.
- ROUTLEDGE, R. T. - *Cancer Chemotherapy. Boerhaave Series 168, 1971.*
- RYAN, T. J., VICKERS, H. R., SALEM, S. N., CALLENDER, S. T. EN BADEHOCH, J. - The treatment of psoriasis with folic acid antagonists. *Brit. J. Derm.* 76: 555, 1964.
- SAUBERLICH, H. E. EN BAUMANN, C. A. - A factor required for growth of leuconostoc citrovorum. *J. Biol. Chem.* 176: 165, 1948.
- SCHOENBACH, E. B., COLSKY, J. EN GREENSPAN, E. M. - Observations on the effects of the folic acid antagonists aminopterin and amethopterin, in patients with advanced neoplasms. *Cancer* 5: 1201, 1952.
- SCHOENBACH, E. B., GREENSPAN, E. M. EN COLSKY, J. - Reversal of aminopterin and amethopterin toxicity by citrovorum factor. *J. Amer. Med. Ass.* 144: 1558, 1950.
- SCHWARZ, G. - Ueber Desensibilisierung gegen Röntgen- und Radiumstrahl. *München. Med. Wochenschr.* 56: 1217, 1909.
- SCOTT, E. J. VAN, AVERBACH, R. EN WEINSTEIN, G. D. - Parenteral methotrexate in psoriasis. *Arch. Derm.* 89: 550, 1964.
- SEEGER, D. R., COSULICH, D. B., SMITH, J. M. EN HULTQUIST, M. E. - Analogs of pteroylglutamic acid. III: 4-amino derivatives. *J. Amer. Chem. Soc.* 71: 1753, 1949.
- SEEGER, D. R., SMITH, J. M. EN HULTQUIST, M. E. - Antagonists for pteroylglutamic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 69: 2567, 1947.
- SNOW, G. B. - *Cancer Chemotherapy. Boerhaave Series 192, 1971.*
- SOUTHARD, M. E., KRAMER, S. EN MANSFIELD, C. M. - Advances in the management of tumors of the head and neck. *Surg. Clin. North Amer.* 47: 1139, 1967.
- STAM, H. C. - *Cancer Chemotherapy. Boerhaave Series 200, 1971.*
- SULLIVAN, R. D. EN DALY, J. F. - The treatment of head and neck cancer with the continuous arterial infusion of methotrexate and the intermittent intramuscular administration of citrovorum factor. *Ann. Otol.* 70: 428, 1961.
- SULLIVAN, R. D., MILLER, E., CHRYSOCHOOS, T. EN WATKINS, E. - The clinical effects of the continuous intravenous and intra-arterial infusion of cancer chemotherapeutic compounds. *Cancer Chemother. Rep.* 16: 499, 1962.
- SULLIVAN, R. D., MILLER, E. EN DUFF, J. K. - Effects of continuous intra-arterial methotrexate with intermittent intramuscular citrovorum factor therapy in human cancer. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 3: 271, 1961.
- SULLIVAN, R. D., MILLER, E., ZUREK, W. Z., OBERFIELD, R. A. EN OJIMA, Y. - The re-evaluation of methotrexate as an anticancer drug. *Surg. Gynec. Obstet.* 125: 819, 1967.
- SULLIVAN, R. D. EN OBERFIELD, R. A. - Methotrexate in advanced cancer. *Lahey Clinic Foundation* 1969.
- SZYBALSKY, W. - The radiosensitizing effect of the halogenated thymidine analogs. In: *Proceedings, Carmel Conference on „Experimental Advances in Radiotherapy“.* 1960.
- THIERSCH, J. B. EN PHILIPS, F. S. - Effects of 4-amino-pteroylglutamic acid in dogs with special reference to megaloblastosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 71: 484, 1949.
- THIERSCH, J. B. EN PHILIPS, F. S. - Effects of 4-amino-pteroylglutamic acid on early pregnancy. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 74: 204, 1950.

- THOMLINSON, R. H. - The effects of irradiation on the proportion of anoxic cells in tumours. Communication at third Int. Congr. of Radiation Research. Cortino d'Ampezzo, Abstr. no. 878, 1966.
- WELCH, A., HEINLE, R. W., SHARPE, G., GEORGE, W. L. en EPSTEIN, M. - Chemical Antagonism of PGA in a pig. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 65: 364, 1947.
- WERKHEISTER, W. C. - Specific binding of 4-aminofolicacid-analogues by folicacid reductase. J. Biol. Chem. 236: 888, 1961.
- WOODS, D. D. - The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. Brit. J. Exper. Path. 21: 74, 1940.
- ZUREK, W. Z., ANDERSON, L. L., OBERFIELD, R. A. en SULLIVAN, R. D. - Pharmacologic studies of methotrexate in man. Surg. Gynec. Obstet. 126: 331, 1968.